



Sebastião Costa Ravasco

Licenciado em Química Aplicada à Biotecnologia
Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

**Regulação epigenética de um gene de resposta a *stress* de
frio em arroz (*OsDREB1B*)**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Bioquímica

Orientadores: Doutora Ana Paula Leitão dos Santos, ITQB UNL

Doutor Nelson José Madeira Saibo, ITQB UNL

Coordenador de curso: Doutor José Ricardo Ramos Franco Tavares, FCT-UNL

Arguente: Doutora Rita Sobral Moutinho Abranches, ITQB UNL



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Outubro de 2015

Indicação dos direitos de cópia

O trabalho aqui apresentado é da autoria do mestrando Sebastião Costa Ravasco, sob co-orientação da Dr.^a Ana Paula Santos e Dr. Nelson Saibo. Este estudo foi realizado com os recursos disponibilizados pelo grupo Genomics of Plant Stress (GPlantS), Instituto de Tecnologia Química e Biológica, em Oeiras, Portugal.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Dedicatória e Agradecimentos

Agradeço a todos os membros do grupo *Genomics of Plant Stress* (GPlantS) do ITQB por ajudarem jovens cientistas a encontrar um porto seguro e competitivo, onde possam aprender ciência e técnicas, e também encontrar opções mais abrangentes e valiosas para uma carreira futura. Porque o mundo precisa de se renovar, e todos precisamos de nos inspirar para mudar o que existe, deixo uma palavra de grande apreço ao grupo que me acolheu, por se mostrar aberto e de mente aberta, e ainda por encontrar nos interessados o potencial que um ambiente sistémico e estandardizado tem vindo a denegrir cada vez mais ao longo dos anos.

Aos meus orientadores, Ana Paula Leitão dos Santos e Nelson José Madeira Saibo, que confiaram em mim e me permitiram aprender livremente com os colegas com que tive a sorte de trabalhar. Foram ambos um excelente exemplo de pessoas que contribuem com conhecimento - na vanguarda da investigação em genómica de plantas a nível internacional – sendo igualmente pessoas modestas e íntegras com quem se tem prazer em trabalhar.

Agradeço também à Liliana Ferreira, por me ter instruído em técnicas que até então não me eram familiares, e por me ter levado a dominar tais procedimentos. Por todo o tempo que me dedicou, e pela paciência e amizade com que me ensinou, fico-lhe eternamente grato.

Ao André Cordeiro, por me ter aturado tantas perguntas dos mais variados âmbitos, e que por vezes lhe seriam inoportunas.

Ao Diego Almeida, por todas as vezes que foi interrogado sobre procedimentos e teoria de qPCR, e pela assiduidade a libertar-nos para a hora de almoço.

À Natacha Vieira, Vanessa Azevedo e Joana Machado, pelas palhaçadas, ajuda e bem-estar; são muito boas pessoas, e, apesar de tresloucadas, têm caracteres de relevar.

Aos restantes membros do GPlantS, por estarem sempre disponíveis nas situações de maior tensão ou necessidade, nas festas, nas discussões acaloradas sobre como funcionar em grupo, nas despedidas, no dia de limpeza dos laboratórios, ou mesmo no silêncio. Pelo bom senso de todos, e não pelo senso comum.

Aos meus pais, Catarina Maria Manso de Oliveira Costa Ravasco e José António Arantes e Oliveira de Carvalho Ravasco, que acreditam em mim e suportaram o meu percurso académico e pessoal.

Aos meus avós, que sempre tiveram uma palavra amiga e interessada: José Joaquim Lebre de Carvalho Ravasco e Isabel Pinto dos Santos da Fonseca Menéres Martins Manso que perdurarão sempre na memória; Maria Emília Pinto da Silva Arantes e Oliveira de Carvalho Ravasco por ser um porto seguro, e sempre um ouvido amigo; e Vasco Gastão Figueiredo Oliveira Costa, pela diversão que é, e pela perseverança que ensina. Principalmente a José Lebre Ravasco que foi um grande amigo e cuja presença me faz, e fará, sempre falta; gostava que tivesse testemunhado o engrandecimento do mancebo, mas não sendo possível vou viver para honrar a sua memória.

Finalmente, a todas as minhas famílias de amigos que pelo país se encontram espalhadas – parte, pelo mundo desvanecidas - mas que me conhecem, e participaram em mim.

Dedico este trabalho a todos os mencionados, mas, principalmente, ao meu avô José Lebre Ravasco, e aos ideais e princípios que a honra e nobreza impõem, e dos quais este mundo tanto necessita.

Resumo

O arroz (*Oryza sativa* L.) constitui a principal fonte de alimento para mais de metade da população mundial. O frio tem um grande impacto no desenvolvimento da planta de arroz com efeitos negativos ao nível da produtividade e economia mundial. Os mecanismos epigenéticos associados a alterações estruturais da cromatina estão envolvidos nos mecanismos de resposta das plantas a *stresses* abióticos. O foco do presente trabalho consistiu na compreensão da influência de fatores epigenéticos, nomeadamente de modificações de histonas, na regulação transcricional de um gene específico (*OsDREB1B*) envolvido na resposta de arroz ao *stress* de frio. O estudo da regulação epigenética deste gene envolveu a utilização de plantas de arroz com mutações em enzimas epigenéticas e drogas remodeladoras da cromatina.

Neste trabalho mostramos que o gene *OsDREB1B* é induzido pelo *stress* de frio (4 °C) em todas os genótipos de arroz analisados, no entanto, a indução do gene em resposta ao *stress* de frio é maior em Nipponbare que em Dongjin. Nos genótipos que apresentam epimutações, nomeadamente o *knockout* de *osdrm2* (DMT706) e de *oshac704* (HAC704), o gene *OsDREB1B* é mais expresso que no respetivo genótipo selvagem (Dongjin), sendo que a indução da expressão em resposta ao frio foi maior em DMT706 do que em HAC704. A análise do padrão de marcas histónicas ao longo do promotor de *OsDREB1B*, através da imunoprecipitação da cromatina (ChIP) com anticorpos específicos, revelou que, em resposta ao frio (4°C), Dongjin apresenta uma menor predominância da marca H3K9ac na região de -519 a -355 pares de bases (antes do ATG), enquanto que Nipponbare possui maior presença de H4K5ac na região de -280 a -121 pares de bases, sugerindo que a regulação epigenética de *OsDREB1B* seja influenciada pelo genótipo. No caso dos epi-mutantes (HAC704 e DMT706) registou-se um empobrecimento das marcas histónicas testadas sugerindo que a indução da expressão do *OsDREB1B* em resposta ao *stress* provocado pelo frio não depende necessariamente da presença de *OsDRM2* nem de *OsHAC704*.

Uma visão integrada da paisagem epigenética e do transcriptoma, perspectiva uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na resposta da planta a condições ambientais adversas, abrindo novas linhas de trabalho no sentido de obter plantas mais tolerantes a fatores de *stress*.

KEY WORDS: Arroz (*Oryza sativa*), cromatina, epigenética, código histónico, *stress* de frio, epimutações, imunoprecipitação da cromatina

Summary

Rice (*Oryza sativa* L.) constitutes the main source of food for more than half of the world's population. Cold stress has a big impact on rice development, and side effects on worldwide production and economy. The epigenetic mechanisms associated with chromatin structural alterations are involved in plant abiotic stress responses. The present work's aim consisted on understanding the influence of epigenetic factors, namely histone modifications on the transcriptional regulation of a specific gene (*OsDREB1B*) involved in rice's cold stress response. The study of the epigenetic regulation of this gene involved utilization of rice plants with mutations on epigenetic enzymes and chromatin remodeling drugs.

In this work we show that the gene *OsDREB1B* is induced by cold stress (4 °C) in all the analysed genotypes, however, the gene over-expression in cold stress is higher in Nipponbare than in Dongjin. With the presence of epimutations, namely *osdrm2* (DMT706) and *oshac704* (HAC704) the gene *OsDREB1B* is more expressed than in Dongjin (wt), being its induction of expression in response to cold stress higher in DMT706 than in HAC704. The analysis of the histone mark pattern along *OsDREB1B*'s promoter through chromatin immunoprecipitation (ChIP) with specific antibodies, revealed that Dongjin presented a higher predominance of H3K9ac within -519 to -355 bp relative to ATG in control conditions (28 °C) whilst Nipponbare showed higher presence of H4K5ac within -280 to -121 bp under cold stress (4 °C) suggesting that the epigenetic regulation of *OsDREB1B* is influenced by genotype. Mutant-wise (HAC704 and DMT706) a lessening of both marks' presence was registered, suggesting that the expression of *OsDREB1B* in cold stress doesn't necessarily depend on the presence of *OsDRM2* nor *OsHAC704*.

An integrated vision of the epigenetic landscape with the expression of genes leads to a better perspective and understanding of the epigenetic mechanisms involved in plants adverse environment responses opening new lines of work in the sense of attaining plants that are tolerant to stress factors.

KEY WORDS: Rice (*Oryza sativa*), chromatin, epigenetics, histone code, cold stress, histone code, epimutations, chromatin immunoprecipitation

Índice de matérias

INDICAÇÃO DOS DIREITOS DE CÓPIA	III
DEDICATÓRIA E AGRADECIMENTOS	V
RESUMO	VII
SUMMARY	IX
ÍNDICE DE MATÉRIAS.....	XI
ÍNDICE DE TABELAS	XVIII
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	XIX
I - INTRODUÇÃO.....	23
1. Porquê estudar o arroz?.....	23
2. O impacto do frio na produtividade de arroz	24
3. Mecanismos de resposta da planta ao frio.....	25
i. Alterações induzidas por <i>stress</i> osmótico.....	25
ii. Genes envolvidos na resposta da planta ao frio.....	26
4. Regulação da expressão de genes de resposta ao frio	28
i. Regulação pós-transcricional.....	28
ii. Regulação pós-translacional	28
iii. Regulação via influência dos plastídeos/organelos	29
5. Regulação Epigenética: mecanismos e funções	30
i. Flexibilidade da estrutura da cromatina	31
ii. Modificações de histonas	32
iii. Metilação do DNA	35
iv. Conexões entre metilação do DNA e modificações histónicas	37
v. Pequenos RNAs não-codificantes (ncRNAs).....	37
6. Ferramentas de análise de padrões epigenéticos	37
II - OBJETIVOS DA TESE	41
III - MATERIAIS E METODOLOGIA	43
1. Material biológico	44
2. Imposição do <i>stress</i> de frio.....	44

3.	Aplicação de drogas remodeladoras da cromatina	45
4.	Estudos de Expressão	46
i.	Extração, purificação e quantificação de RNA	46
ii.	Síntese de cDNA	47
iii.	Quantificação relativa de transcritos (qPCR)	47
5.	Imunoprecipitação da cromatina (ChIP)	49
i.	Otimização do processo de ChIP através de ensaio FAIRE	49
ii.	Infiltração/Crosslink	50
iii.	Isolamento de núcleos	50
iv.	Sonicação da cromatina	51
v.	Imunoprecipitação da cromatina e “ <i>decrosslink</i> ”	51
vi.	Quantificação de marcas por qPCR	52
IV -	RESULTADOS	53
1.	O gene <i>OsDREB1B</i> é induzido pelo frio em diferentes genótipos	53
2.	A indução do gene <i>OsDREB1B</i> pelo frio é potenciada pela presença de epimutações	55
3.	A expressão do gene <i>OsDREB1B</i> é influenciada pelo tratamento com drogas remodeladoras da cromatina	57
4.	Análise de modificações das histonas no promotor do gene <i>OsDREB1B</i> em resposta ao frio através de ChIP-qPCR	60
i.	Os padrões histônicos no promotor de <i>OsDREB1B</i> são influenciados pelo genótipo	63
ii.	Redução das marcas H3K9ac e H4K5ac nos epi-mutantes	65
V -	DISCUSSÃO	69
1.	A indução da expressão do gene <i>OsDREB1B</i> em resposta ao frio é influenciada pelo genótipo e pela intensidade luminosa	69
2.	A indução da expressão do gene <i>OsDREB1B</i> pode ser correlacionada com o padrão de modificações de histonas	71
3.	A indução da expressão do gene <i>OsDREB1B</i> em resposta ao frio é potenciada pela presença de epimutações	73
4.	Alteração da paisagem histónica em mutantes epigenéticos	73
5.	A indução da expressão do gene <i>OsDREB1B</i> em resposta ao frio é influenciada pelo tratamento com drogas remodeladoras da cromatina	76
VI -	CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS	77
VII -	BIBLIOGRAFIA	78

VIII - ANEXOS	89
Mutantes de Dongjin	89
Soluções	90

Índice de figuras

Figura 1 – Redes genética e metabólicas envolvidas na resposta ao stress de frio em plantas. Adaptada de [Chinnusamy <i>et al.</i> , 2007].	27
Figura 2 – Paisagem epigenética descrita por Waddington (1942). Imagem adaptada de Waddington <i>et al.</i> , (1957).	31
Figura 3 – Organização estrutural da cromatina. Estão representados diferentes níveis de compactação da cromatina [adaptada de Konsta <i>et al.</i> , (2014)].	32
Figura 4 - Etapas do processo experimental subjacente ao presente trabalho: (1) selecção do material biológico, esterilização e germinação das sementes, crescimento das plantas e imposição de stress; (2) estudos de expressão e (3) imunoprecipitação da cromatina.	43
Figura 5 – Germinação, crescimento e imposição de tratamentos. Sementes após três dias de germinação (A); Plântulas de arroz com 13 dias de crescimento (B); Ensaio e tratamentos efetuados.	45
Figura 6 – Estudo de expressão do gene OsDREB1B. A expressão relativa do OsDREB1B foi calculada dividindo o número de transcritos de OsDREB1B pelos do gene normalizador OsUBC2 (housekeeping gene). Os gráficos em baixo são uma ampliação da escala de transcritos, de forma a clarificar as variações em condições controlo. Ensaio feito com intensidades luminosas: (A – esquerda) de crescimento a 500µmol de fotões.m ⁻² .s ⁻¹ e de stress a 200µmol de fotões.m ⁻² .s ⁻¹ ; (B – direita) de crescimento e stress a 200 µmol de fotões.m ⁻² .s ⁻¹ .	54
Figura 7 – Estudo de sobre-expressão do gene OsDREB1B em condições controlo versus stress. As razões de amplificação (RA) da expressão de <i>OsDREB1B</i> (relativas a <i>OsUBC2</i>) foram obtidas pela normalização com as respectivas amostras controlo [RA (amostra X) = $\left(\frac{DREB1B}{UBC2}(amostra\ X)\right) / \left(\frac{DREB1B}{UBC2}(controlo\ wt)\right)$] – RA de controlos é igual a 1. Ensaio feito com intensidades luminosas: (A) de crescimento a 500µmol de fotões.m ⁻² .s ⁻¹ e de stress a 200µmol de fotões.m ⁻² .s ⁻¹ ; (B) de crescimento e stress a 200 µmol de fotões.m ⁻² .s ⁻¹ .	54
Figura 8 - Representação populacional de Oryza sativa L. wt (A) e plantas com mutações em moduladores epigenéticos (B e C) em condições controlo, após 13 dias de desenvolvimento. Dongjin (A), HAC704 (B) e DMT706 (C).	56
Figura 9 - Estudo de expressão do gene OsDREB1B. A expressão relativa do <i>OsDREB1B</i> foi calculada dividindo o número de transcritos de <i>OsDREB1B</i> pelos do gene normalizador <i>OsUBC2</i> (housekeeping gene). Os gráficos em baixo são uma ampliação da escala de transcritos, de forma a clarificar as variações em condições controlo. Ensaio feito com intensidades luminosas: (A – esquerda) de crescimento a 500µmol de fotões.m ⁻² .s ⁻¹ e de stress a 200µmol de fotões.m ⁻² .s ⁻¹ ; (B – direita) de crescimento e stress a 200 µmol de fotões.m ⁻² .s ⁻¹ .	56
Figura 10 – Estudo de sobre-expressão do gene OsDREB1B em condições de controlo versus stress. As razões de amplificação (RA) da expressão de <i>OsDREB1B</i> (relativa a <i>OsUBC2</i>) foram obtidas pela normalização com a amostra controlo do wt [RA (amostra X) = $\left(\frac{DREB1B}{UBC2}(amostra\ X)\right) / \left(\frac{DREB1B}{UBC2}(controlo\ wt)\right)$]. Ensaio feito com intensidades luminosas: (A) de crescimento a 500µmol de fotões.m ⁻² .s ⁻¹ e de stress a 200µmol de fotões.m ⁻² .s ⁻¹ ; (B) de crescimento e de stress a 200 µmol de fotões.m ⁻² .s ⁻¹ .	56

Figura 11 - **Estudo de expressão do gene *OsDREB1B* em diferentes genótipos e em mutantes após o tratamento com drogas remodeladoras da cromatina.** O número de transcritos normalizados de *OsDREB1B* foi calculado dividindo o número de transcritos de *OsDREB1B* pelos de *OsUBC2* (*housekeeper*). O gráfico em baixo é uma ampliação da escala de transcritos, de forma a clarificar as variações em condições controlo. Ensaio de frio (4h a 4°C) com meio Yoshida sem ou com drogas (TSA 15 µM, ou 5-AC 80 µM) sob intensidade luminosa constante (200 µmol de fótons.m⁻².s⁻¹). *Não estão representados resultados de controlo (sem droga) para Dongjin, nem de stress (TSA) para HAC704..... 58

Figura 12 - **Estudo de sobre-expressão do gene *OsDREB1B* em diferentes genótipos e em mutantes após o tratamento com drogas remodeladoras da cromatina.** Os dados referem-se a amostras de stress de frio (4h a 4 °C), normalizadas com os controlos das respectivas linhas e meios. O gráfico em baixo é uma ampliação da escala de sobre-expressão, de forma a clarificar as variações entre ensaios. *Não estão representadas a amostra de stress em meio sem droga de Dongjin, nem a de HAC704 em meio com tricostatina A (TSA). 59

Figura 13 – Quantidade relativa de fragmentos amplificados por qPCR, obtidos de amostras cuja cromatina foi fixada com 0%, 0.8% e 1% de p-formaldeído, durante um minuto de infiltração. Para cada condição purificou-se DNA fixado, cuja fixação foi, ou não, revertida – decrosslink e crosslink respetivamente. O gráfico em baixo é uma ampliação para clarificar relações entre amostras crosslink. 61

Figura 14 – Quantidade relativa de fragmentos amplificados por qPCR, obtidos de amostras cuja cromatina foi fixada com 0% (H₂O) e 0.8% (4 e 28 °C) de p-formaldeído, durante um minuto de infiltração. A cromatina das duas amostras comparadas foi obtida em condição de stress a estudar e em controlo. Para cada condição purificou-se DNA, cuja fixação foi, ou não, revertida – decrosslink e crosslink respetivamente. O gráfico em baixo é uma ampliação para clarificar relações entre amostras crosslink. 61

Figura 15 – **Sonicação da cromatina.** Cromatina sonicada (B, D, F, H, J, M, O, Q) e não-sonicada (A, C, E, G, I, L, N, P) em gel de electroforese. Foi usado ‘O’gene ruler DNA ladder’ como meio de determinação de tamanhos moleculares (X)..... 62

Figura 16 – **Representação das regiões do promotor de *OsDREB1B* analisadas.** Os fragmentos amplificados estão representados por FR1 [-151; -3]; FR2 [-280; -121]; FR3 [-394; -227]; FR4 [-519; -355]. Os círculos vermelhos indicam os sítios de ligação de fatores de transcrição (zinc-fingers do tipo C2H2) identificados em Nipponbare [Figueiredo *et al.*, 2012]. 63

Figura 17 - **Percentagem de cromatina imunoprecipitada com o anticorpo contra a H3K9ac para determinadas regiões do promotor do gene *OsDREB1B*, de Nipponbare e Dongjin sob condições de controlo (28 °C) e stress (4 °C).** Não está exposto o valor para o fragmento [-394; -227] pb de Nipponbare sob stress. 64

Figura 18 – **Percentagem de cromatina imunoprecipitada com anticorpo contra a H3K9ac para determinadas regiões do promotor do gene *OsDREB1B*, de Nipponbare e Dongjin sob condições de controlo (28 °C) e stress (4 °C).**..... 64

Figura 19 - **Percentagem de cromatina imunoprecipitada com anticorpo contra a H3K9ac para determinadas regiões do promotor do gene *OsDREB1B*, de Dongjin, HAC704 e DMT706 sob condições de controlo (28 °C) e stress (4 °C).** Não estão expostos valores para o controlo da linha HAC704 pois a amostra não pôde ser utilizada. 66

Figura 20 – Percentagem de amostras de cromatina imunoprecipitada com anticorpo contra a H3K9ac para determinadas regiões do promotor do gene <i>OsDREB1B</i> , de Dongjin, HAC704 e DMT706 sob condições de controlo (28 °C) e stress (4 °C).....	67
Figura 21 - Hipótese para a regulação diferencial do gene <i>OsDREB1B</i> em Nipponbare versus Donjin.....	72
Figura 22 - Hipótese para a regulação diferencial do gene <i>OsDREB1B</i> na presença de epimutações.....	75
Figura 23 – Inserções de T-DNA nos genes de interesse (<i>OsDRM2</i> e <i>OsHAC704</i> respetivamente).	89
Figura 24 - RT-PCR semi-quantitativo demonstrando o silenciamento dos genes nas linhas mutantes. <i>OsActin</i> usado como controlo.	89

Índice de tabelas

Tabela 1 - Primers usados para qPCR de ChIP, para a região do promotor de *OsDREB1B*..... 52

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

5mC – 5-metilcitosina / *5-methylcytosine*

5-AC – 5-Azacidina / *5-Azacytidine*

AFM – Microscopia de força atômica / *Atomic force microscopy*

ATP – Trifosfato de adenosina / *Adenosine trisphosphate*

BRD4 – Bromo-domínio 4 / *Bromodomain 4*

CaM - Calmodulina / *Calmodulin*

CAMTA – Ativador de transcrição calmodulino-ligante / *CaM-ligante transcriptional activator*

CBF – Factor de ligação ao terminal-C / *C-repeat binding factor*

CBL – Proteína do tipo calcineurina B / *Calcineurin B-like protein*

CCA1 – Factor de transcrição 1 associado ao ciclo circadiano / *Circadian clock associated 1 transcription factor*

CCaMK – Cinase proteica dependente de cálcio ou calmodulina / *Calcium/Calmodulin dependente protein kinase*

cDNA – DNA codificante / *Coding DNA*

CDPK – Cinase proteica dependente de cálcio / *Calcium-dependent protein kinase*

ChIP – Imunoprecipitação de cromatina / *Chromatin Immunoprecipitation*

CIPK – Cinase proteica CBL-interactuante / *CBL-interacting protein*

CML – Proteína do tipo CaM / *CaM-like protein*

CMT – Cromometiltransferase / *Chromomethyltransferase*

CO₂ – Dióxido de carbono / *Carbon dioxyde*

COR – Genes regulados pelo frio / *Cold-regulated genes*

CpG – sítio de metilação (citosina-guanina) / *methylation site (cytosine-guanine)*

ddH₂O – Água duplamente destilada / *double-distilled water*

DMR – Região diferencialmente metilada / *Differentially methylated region*

DMT – Desmetilase / *Demethylase*

DNA – Ácido desoxirribonucleico / *Deoxyribonucleic acid*

DNMT – Metiltransferase *de novo*, de DNA / *de novo DNA methyltransferase*

DRE/CRT – Elemento de resposta à seca / *Drought-responsive element*

DREB1B – Domínio 1 B, de ligação a elemento de resposta à seca / *Drought-responsive element-binding 1 B*

DRM – Metilases de domínios reordenados / *Domains rearranged methylases*

eIF4A – Fator de iniciação da transcrição 4 A / *Transcription initiation factor 4 A*

ERD – Resposta inicial à desidratação 10 / *Early response to dehydration 10*

FAO – Organização para a Alimentação e Agricultura / *Food and Agriculture Organization*

gDNA – DNA genómico / *genomic DNA*

GSH – Glutathiona reduzida / *Reduced glutathione*

GSSG – Glutathiona oxidada / *Oxidized glutathione*

H3K9me1-3 – Histona 3, mono-, di- ou tri-metilada na nona lisina / *9th lysine, mono-, di- or tri-methylated histone 3*

H4K5ac – Histona 4 acetilada na quinta lisina / *5th lysine acetylated histone 4*

HAT – Acetiltransferase histónica / *Histone acetyltransferase*

HDAC – Desacetilase histónica / *Histone deacetylase*

HDMS – Desmetilase histónica / *Histone demethylase*

HMT – Metiltransferase histónica / *Histone methyltransferase*

HOS – Ligase E3-ubiquitina / *E3-ubiquitin ligase*

HP1 – Proteína heterocromática 1 / *Heterochromatic protein 1*

HsfA3 – Factor de choque de calor A3 / *Heat-shock factor A3*

HSP – Proteína de resposta a choque térmico / *heat shock protein*

ICE – Indutor 1 de expressão de CBF / *Inducer of CBF expression 1*

LEA II – *Late embryogenesis abundant protein*

LHY – Factor de transcrição 1 da elongação tardia do hipocótilo / *Late elongated hypocotyl 1 transcription factor*

miRNA – micro-RNA / *micro-RNA*

mRNA – RNA mensageiro / *messenger RNA*

ncRNA – RNA não-codificante / *non-coding RNA*

MALDI-TOF – Ionização e dessorção laser assistida por matriz, com tempo de voo / *Matrix-Assisted Laser Desorption and Ionisation – Time Of Flight*

MAT1A – Adenosiltransferase de metionina 1 alfa / *Methionine adenosyltransferase 1 alpha*

MET1 – Metilase 1 / *Methylase 1*

MTase – Metiltransferase / *Methyltransferase*

MYB – Família de factores de transcrição / *Transcription factor family*

Os – *Oryza sativa*

PIF – Factor de interacção com fitocromo / *Phytochrome interacting factor*

PSII – Fotossistema II / *Photosystem II*

PTM – Modificação pós-translacional / *Post-translational modification*

qPCR – Quantificação em tempo-real com a reacção de encadeamento de polimerase / *quantitative real-time Polymerase Chain Reaction*

RA – Razão de amplificação (sobre-expressão em condições de *stress versus* controlo) / *Amplification ratio (over-expression for stress to control ratio)*

RdDM – Metilação de DNA direcionada por RNA / *RNA-directed DNA methylation*

RISC – Complexo de silenciamento induzido por RNA / *RNA-induced silencing complex*

RNA – Ácido Ribonucleico / *Ribonucleic acid*

ROS – Espécies reactivas de oxigénio / *Reactive oxygen species*

RubisCO - Carboxilase oxigenase de ribulose-1,5-bis-fosfato / ribulose-1,5-bis-phosphate carboxilase oxigenase

SAM – S-adenil metionina / *S-adenyl methionine*

SAPK – Cinase proteica ativada por stress / *Stress activated protein kinase*

siRNA – Pequeno RNA de interferência / *small interfering RNA*

SIZ – Ligase SUMO E3 (complexo de ligação A/B/acinus/PIAS [SAP] e MIZ) / *SUMO E3 ligase (scaffold attachment factor A/B/acinus/PIAS [SAP] and MIZ)*

SUMO – Modificador semelhante à ubiquitina / *Small ubiquitin-like modifier*

TPP1 – Fosfatase 1 de trealose-6-fosfato / *trehalose-6-phosphate phosphatase 1*

TSA – Tricostatina A / *Trichostatin A*

UBA – Domínio associado à ubiquitina / *Ubiquitin-associated domain*

UV – Ultra-violeta / *Ultra-violet*

I - Introdução

1. Porquê estudar o arroz?

O arroz (*Oryza sativa L.*) é uma das plantas de cultivo com maior importância na história da humanidade, tendo sido alvo de domesticação ao longo de séculos [Callaway *et al.*, 2014]. Atualmente é o segundo cereal mais cultivado do mundo, a seguir ao milho, sendo do ponto de vista cultural, económico e nutricional uma cultura particularmente importante a nível mundial [Khush *et al.*, 1997, Bouman *et al.*, 2007]. O arroz representa a principal fonte de alimento para mais de metade da população mundial [Bouman *et al.*, 2007]. A produção de arroz em todo o mundo representa, em 2002, mais de 520 milhões de toneladas por ano, produzidos em 146 milhões de hectares, com um rendimento de cerca de 3,5 toneladas por hectare [Fairhurst e Dobermann, 2002]. Dado o aumento crescente da população mundial, torna-se imperativo aumentar a produção de arroz e no sentido de responder às necessidades alimentares estima-se que em 2035 seja possível alcançar uma produção global de arroz de aproximadamente 550 milhões de toneladas, o que corresponde a um aumento de consumo africano de arroz na ordem dos 130% relativamente a 2010 [Seck *et al.*, 2012]. De entre os países da comunidade europeia, Portugal apresenta o maior consumo *per capita* de arroz, aproximadamente 16 kg/capita/ano [FAOSTAT, Portugal 2011] mas apesar disso a produção de arroz em Portugal corresponde apenas a aproximadamente 60% do valor consumido [FAOSTAT, Portugal 2011] e este facto deve-se principalmente à extrema sensibilidade do arroz a condições ambientais adversas, por exemplo, o frio. De uma forma geral, as alterações climáticas globais como o aumento da temperatura, salinidade dos solos e de um modo geral ondas imprevisíveis de registos climáticos, contribuem para um aumento da exposição das plantas a condições de *stress* com consequências diretas ao nível da produtividade do arroz [Mittler *et al.* 2010].

O arroz é uma planta modelo para estudos de genómica funcional em monocotiledóneas nomeadamente para cereais na medida em que o genoma de arroz apresenta uma elevada sintonia com outros cereais i.e. a ordem dos genes no cromossoma é muito semelhante à encontrada em outros cereais como o trigo e o milho [Moore *et al.* 1995]. O genoma de arroz é relativamente pequeno (389MB) e está completamente sequenciado (International Rice Genome Sequencing Project, 2005). Adicionalmente, há uma coleção considerável de mutantes que permitem a realização de estudos funcionais ao nível da regulação génica [Krishnan *et al.* 2009].

2. O impacto do frio na produtividade de arroz

A nível mundial, são vários os exemplos do efeito do frio ao nível da produtividade de arroz. Na Austrália, os cultivadores de arroz sofreram perdas de entre 0.5 a 2.5 t/ha em 75% dos anos registados, em consequência das baixas temperaturas durante o estágio reprodutivo [Singh *et al.*, 2005] o que resultou numa perda de 23.2 milhões de dólares por ano [Farrel *et al.*, 2001, Cruz *et al.*, 2013]. No norte do Japão, nomeadamente na região de Tohoku que é uma das mais frias regiões em que se produz arroz, registaram-se reduções severas de produtividade, por exemplo, em 1993 a média de rendimento de arroz em Tohoku foi 44% menor que o normal, resultando numa perda de 0.65 milhões de toneladas de cereal com uma redução de 80% em determinadas regiões [Shimono *et al.*, 2007]. Na Coreia, a produção de arroz também é afetada pela exposição a baixas temperaturas em qualquer fase de desenvolvimento, desde a germinação até à maturação tendo sido registadas perdas de rendimento na ordem dos 26% em áreas de cultivo sujeitas a *stress* de frio durante a fase reprodutiva [Lee, 2001]. No Brasil, o maior produtor de arroz fora da Ásia, as culturas de arroz também são afetadas pela exposição a baixas temperaturas podendo registar-se uma perda de rendimento final até 25% [Bierlen *et al.*, 1997; Clayton e Neves 2011; Lima *et al.*, 2012]. No caso particular de Portugal, a produtividade de arroz também é particularmente afetada pela exposição ao frio o que impede a sua cultura a norte do Mondego. Por exemplo, em 2011, a produção de arroz em Portugal atingiu 122.000 toneladas o que representa apenas cerca de 60% das necessidades do país [FAOSTAT, Portugal 2011].

Dada a particular sensibilidade do arroz ao *stress* de frio tem-se procurado obter variedades de arroz que apresentem algum grau de tolerância a baixas temperaturas [Sasaki *et al.*, 1997]. Existem dois grupos maioritariamente referidos de variedades, *japonica* e *indica* [Kato *et al.*, 1928], sendo *japonica* o grupo que apresenta mais variedades tolerantes ao frio [Glaszmann *et al.*, 1990; Mackill e Lei, 1997]. Foram já identificadas várias linhas com diferentes graus de tolerância ao frio, tais como as variedades *japonica Odae*, *Dongjin*, *Stejaree* [Kim *et al.*, 2009] e *Nipponbare* [Jiang *et al.*, 2008]. As temperaturas baixas na ordem dos 0 aos 15 °C têm um impacto acentuado em fases sensíveis do desenvolvimento como a germinação e a fase reprodutiva [Zhang *et al.*, 2013, Kim *et al.*, 2011]. O frio está associado à degeneração da panícula, anormalidades na formação do grão, nomeadamente a maturação irregular do grão com um consequente atraso na produção e redução da fertilidade e qualidade [Suh *et al.*, 2010]. Segundo Heenan (1984), em variedades sensíveis ao frio apenas 30% das panículas permanecem férteis após 4 dias de exposição a 12 °C, estando correlacionada a influência deste *stress* no número de grãos e esterilidade do pólen durante a ântese [Nishiyama, 1984; Satake e Hiroshi, 1970]. Outros efeitos do frio manifestam-se ao nível do desenvolvimento da planta verificando-se um atraso na germinação, induzindo também uma diminuição do tamanho das plantas e da sua capacidade fotossintética em grande parte associada à despigmentação foliar (clorose) [Yoshida *et al.*, 1996].

Adicionalmente, as temperaturas baixas e/ou congelantes estão associadas a *stress* osmótico [Chinnusamy *et al.*, 2004] e potencialmente a necroses ou mesmo à morte da planta. Em contraste, as variedades tolerantes a baixas temperaturas são, obviamente, capazes de crescer nessas condições, embora possam também apresentar alguns dos sintomas mencionados [Sanghera *et al.*, 2011].

3. Mecanismos de resposta da planta ao frio

A resposta ao frio é muito complexa envolvendo várias vias metabólicas, compartimentos celulares e mecanismos de regulação genética [Hannah *et al.*, 2005]. Geralmente, plantas de origem tropical, ou subtropical, exibem graus variáveis de tolerância ao frio, podendo aumentar esta tolerância quando exposta a baixas temperaturas. Este processo denomina-se aclimação [Tomashow *et al.*, 1999]. Neste contexto, a adaptação ao *stress* de frio durante a aclimação envolve uma reprogramação da expressão genética e modificações ao nível do metabolismo [Chinnusamy *et al.*, 2010].

i. Alterações induzidas por *stress* osmótico

Os sensores diretos de baixas temperaturas são ainda desconhecidos mas é sabido que as plantas podem sentir variações de temperatura através da alteração física das propriedades membranares ou mais concretamente da redução da fluidez membranar durante o *stress* de frio [Orvar *et al.*, 2000] o que pode induzir a expressão de genes de resposta ao frio nomeadamente dos genes COR (*cold-regulated genes*) [Orvar *et al.*, 2000; Sangwan *et al.*, 2001]. Imediatamente após a exposição a um *stress* de frio ocorre um aumento de Ca^{2+} citosólico, induzido pela redução na fluidez membranar e cujo aumento transiente regula a expressão de genes COR [Knight *et al.*, 1991]. O sinal nuclear do Ca^{2+} pode ser decodificado por várias vias tais como CaM (*calmodulin*) e CMLs (*CaM-like*), CDPKs e/ou CCaMK (*Ca^{2+} - and Ca^{2+} /CaM-dependent protein kinases*), CAMTA (*CaM-ligand transcriptional activator*), CBLs (*calcineurin B-like proteins*) e CIPKs (*CBL-interacting protein kinases*). Adicionalmente, o aumento de Ca^{2+} citosólico pode também implicar um aumento da sua concentração ao nível do núcleo via complexos porosos [Mauger *et al.*, 2012] originando potenciais interações com reguladores genéticos, incluindo de genes COR.

ii. Genes envolvidos na resposta da planta ao frio

A relevância dos genes COR na resposta ao frio tem sido extensivamente referida [Dubouzet *et al.*, 2003; Chinnusamy *et al.*, 2003; Jaglo-Ottosen *et al.*, 1998; Hundermarkt *et al.*, 2008; Tomashow *et al.*, 1998; Kiyosue *et al.*, 1994; Kovacs *et al.*, 2008]. Em *Arabidopsis*, por exemplo, os genes COR78/RD29A, COR47, COR15A e COR6.6 codificam desidrinas, também conhecidas como proteínas LEA do grupo 2 (LEA II) [Ingram *et al.*, 1996] induzidos pelo *stress* de frio [Tomashow *et al.*, 1998]. Pensa-se que as proteínas LEA são importantes para a estabilização membranar e prevenção da agregação proteica [Hundermarkt *et al.*, 2008]. As Desidrinas ERD10 (*early response to dehydration10*) e ERD14 funcionam como “chaperones” interagindo com vesículas fosfolipídicas através de forças eletrostáticas [Kiyosue *et al.*, 1994; Kovacs *et al.*, 2008]. Outras proteínas, como a HSP (*heat shock protein*), têm a sua expressão também induzida pelo frio [Timperio *et al.*, 2008]. A HSP tem como função proteger a membrana celular, renaturar e desagregar proteínas [Timperio *et al.*, 2008; Renaut *et al.*, 2006].

Em arroz a sobre-expressão de TPP1 (*trehalose-6-phosphate phosphatase 1*) melhora a tolerância da planta ao frio [Ge *et al.*, 2008]. A trealose é um dissacárido não redutível que atua como um metabolito de proteção de *stress* e a sua acumulação tem sido associada a uma melhor tolerância da planta ao frio e a outros stresses abióticos [Jang *et al.*, 2003]. O frio, em arroz, induz, através da fosforilação mediada por CDPKs (estimulada por Ca^{2+} - Figura 1) [Martin e Busconi 2001; Chinnusamy *et al.*, 2007] a expressão dos genes *OsICE1* e *OsICE2* [Nakamura *et al.*, 2011] que por sua vez induzem sequencialmente os genes *OsDREB1B* [Dubouzet *et al.*, 2003; Gutha e Reddy, 2008], *OsHsfA3* [Liu *et al.*, 2010] e *OsTSP1* (síntese de trealose) [Pramanik e Imai, 2005] que são fatores de transcrição de genes de resposta a *stress* e que consequentemente regulam os COR (ou genes regulados pelo frio) [Nakamura *et al.*, 2011].

O gene *DREB1B* foi inicialmente identificado em *Arabidopsis*, mas é atualmente reconhecido como estando presente em muitas outras espécies tais como o arroz [Dubouzet *et al.*, 2003], milho [Qin *et al.*, 2004], videira [Xiao *et al.*, 2006] e algodão [Shan *et al.*, 2007] demonstrando assim a sua relevância biológica. A expressão de *DREB1B* como parte da resposta a variados stresses abióticos nomeadamente osmótico [Gutha *et al.*, 2008], seca [Figueiredo *et al.*, 2012], frio (ou temperatura) [Qin *et al.*, 2007; Gutha *et al.*, 2008] e contacto [Gilmour *et al.*, 1998; Figueiredo *et al.*, 2012] tem sido extensivamente estudada tendo-se detetado elevados níveis de sobre-expressão deste gene. Em arroz, o *DREB1B* (LOC_Os09g35010, *Oryza sativa*) tem sido extensivamente referido como tendo um papel particularmente relevante na resposta ao *stress* de frio. Este gene pertence à sub-família *Drought/Dehydration Responsive Element Binding 1* ou *C-REPEAT BINDING FACTOR* (*DREB1/CBF*). Estas proteínas ligam-se a elementos de resposta à secura (*DREBs*) especialmente *DREB1A*, *DREB1B*, *DREB2A* e *DREB2B*, e são os fatores de transcrição mais relevantes na regulação da expressão de genes em resposta ao frio, salinidade, desidratação e toque/contacto [Stockinger *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1998; Dubouzet *et*

al., 2003]. Estas proteínas ligam-se especificamente a elementos *cis* DRE/CRT, A/GCCGAC e ativam a transcrição de genes de resposta a *stress* (incluindo COR) [Baker *et al.*, 1994; Yamaguchi-Shinozaki *et al.*, 1994; Maruyama *et al.*, 2004]. Em linhas transgênicas de arroz, a sobre-expressão do gene *OsDREB1* resulta numa maior tolerância a temperaturas congelantes, à secura e ainda à elevada salinidade [Ito *et al.*, 2006].

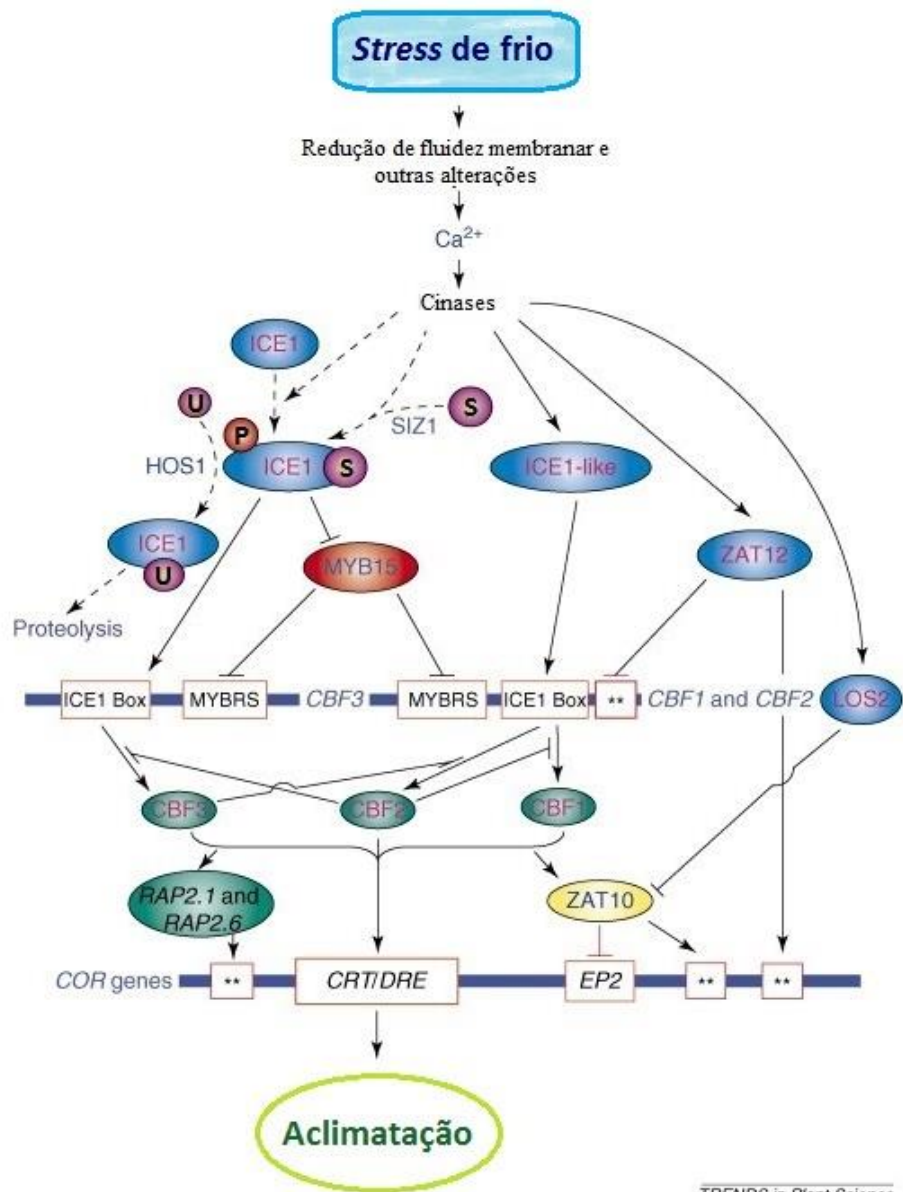


Figura 1 – Redes genética e metabólica envolvidas na resposta ao *stress* de frio em plantas. Adaptada de [Chinnusamy *et al.*, 2007].

4. Regulação da expressão de genes de resposta ao frio

Têm sido identificados vários fatores responsáveis pela regulação da expressão dos genes *DREB1/CBF*. Em *Arabidopsis* foram identificados vários fatores de transcrição com papel regulador da expressão dos genes *DREB1/CBF* como é o caso do ICE1 [Chinnusamy *et al.*, 2003], CAMTA3 [Doherty *et al.*, 2009], MYB15 [Agarwal *et al.*, 2006], PIF7 [Kidokoro *et al.*, 2009] e CCA1 e LHY [Dong *et al.*, 2011]. Em arroz, foram identificados vários fatores de transcrição, nomeadamente Zn-Finger, como reguladores da expressão do gene *OsDREB1B* [Figueiredo *et al.*, 2012]. Adicionalmente, outros fatores, tais como a exportação de mRNA e translação proteica, foram também descritos como tendo um papel na modulação dos níveis de *DREB1/CBF* [Gong *et al.*, 2005; Guo *et al.*, 2002].

i. Regulação pós-transcricional

Os mecanismos pós-transcricionais baseados em *splicing* alternativo, processamento de pré-mRNA, estabilidade e silenciamento de RNA, e exportação do núcleo têm um papel muito importante na aclimação e tolerância ao frio. O processamento e exportação de pré-mRNA são processos muito importantes na regulação da expressão genética [Han *et al.*, 2011]. As plantas regulam a exportação, dependente de *stress*, de mRNA do núcleo e da tradução seletiva de genes associados a *stress*, aumentando a estabilidade dos transcritos [Ambrosone *et al.*, 2012]. A sequenciação de cDNAs de arroz demonstrou que 21% dos genes expressos sofrem *splicing* alternativo [Wang *et al.*, 2006]. Apesar de a maioria dos *splices* alternativos não estar ainda caracterizada, foi demonstrado o papel de vários genes codificantes de cinases proteicas, fatores de transcrição e reguladores de *splicing* na otimização de respostas a stresses abióticos [Zhou *et al.*, 2008].

ii. Regulação pós-translacional

Em arroz existem duas proteínas, OsICE1 e OsICE2, funcionalmente conservadas em plantas superiores, que reconhecem domínios MYC, e que têm como função regular a expressão dos genes *OsDREB1B*, *OsHsfA3* e *OsTSPP1* e de outros genes específicos envolvidos na regulação da resposta ao *stress* de frio (CORs) [Nakamura *et al.*, 2011; Toledo-Ortiz *et al.*, 2003; Zarka *et al.*, 2003; Zhu *et al.*, 2007]. Estes intervenientes na regulação da resposta ao frio são expressos sob *stress* de frio ou de salinidade [Chinnusamy *et al.*, 2003; Nakamura *et al.*, 2011]. Ainda não se sabe como é regulada a expressão e manutenção destas proteínas em arroz, no entanto foi já demonstrada a variação da sua atividade de acordo com diferentes modificações pós-translacionais [Nakamura *et al.*, 2011]. Segundo Lourenço *et al.*, (2013), em arroz, ICE1

demonstrou ter degradação dependente da ubiquitinação por parte de OsHOS1 (*E3-ubiquitin ligase*), a par do que foi demonstrado em *Arabidopsis thaliana* [Dong *et al.*, 2006; Miura e Hasegawa, 2010]. Em *Arabidopsis*, a degradação de ICE1 pela SUMOilação dependente de SIZ1 foi também correlacionada com a resposta ao *stress* de frio [Miura *et al.*, 2007]. Os homólogos de SIZ1 em arroz, OsSIZ1 e OsSIZ2, também são passíveis de SUMOilar, mas o seu envolvimento na regulação das OsICE1-2 ainda não está estabelecido [Park *et al.*, 2010]. A fosforilação de AtICE1 em regiões ricas em serinas também está envolvida na sinalização do *stress* de frio [Chinnusamy *et al.*, 2003]. Muito embora ainda não estejam caracterizados os intervenientes diretos nesta fosforilação, existem várias linhas de investigação que já demonstraram a variação da expressão e atividade enzimática de cinases proteicas dependentes de Ca^{2+} em arroz, tais como as OsCDPKs [Wan *et al.*, 2007] e OsSAPK [Kobayashi *et al.*, 2005]. É portanto razoável assumir o envolvimento destas cinases na fosforilação das proteínas OsICE [Chinnusamy *et al.*, 2003] levando à indução de genes “downstream” induzidos por frio, através da ubiquitinação ou SUMOilação destas proteínas [Dong *et al.*, 2006; Miura e Hasegawa, 2010; Miura *et al.*, 2007].

iii. Regulação via influência dos plastídeos/organelos

Tal como no caso das membranas, os cloroplastos têm também um papel na perceção da temperatura ambiente por parte das plantas [Huner *et al.*, 1998; Ivanov *et al.*, 2012]. As baixas temperaturas geram um desequilíbrio entre a capacidade de aproveitar a energia luminosa incidente e a capacidade de a transformar em metabolitos redutores, causando uma pressão de excitação excessiva no Fotossistema II (PSII). Este processo, denominado de fotoinibição, pode levar à produção de espécies reativas de oxigénio (ROS) que por sua vez podem levar à degradação do aparato fotossintético, danificando células inteiras e atuando presumivelmente como um mensageiro secundário [Scheller *et al.*, 2005; Tyystjarvi *et al.*, 2013]. Uma vez que a fixação fotossintética de CO_2 é muito limitada a baixas temperaturas, a fotoinibição ocorre também sob condições de pouca luminosidade [Takahashi e Murata, 2008]. A tolerância a baixas temperaturas induzida pela fotoinibição e regulada pela fixação de CO_2 , pode portanto ser um dos mecanismos envolvidos na aclimação ao frio. A sobre-redução do PSII pode também atuar como um dos sinais de indução de expressão de CORs, pois muitos destes genes também atuam sob condições de elevada luminosidade [Ndong *et al.*, 2001]. Variedades tolerantes ao frio, como o espinafre, trigo invernal, centeio ou fava, conseguem manter altas velocidades de assimilação de CO_2 , por alterarem o conteúdo de RubisCO e a eficiência de azoto, dependendo da temperatura ambiente enquanto plantas sensíveis ao frio como é o caso do arroz, pepino ou tabaco não conseguem levar a cabo essa estratégia [Yamori *et al.*, 2010]. A intensidade luminosa e a temperatura ambiente podem estar integradas na alteração do consumo de eletrões de transdução

de sinal nos cloroplastos, e na iniciação do sinal do percurso metabólico transdutor [Ivanov *et al.*, 2012] explicando a coordenação de expressão genética, entre plastídeos e núcleo, necessária à adaptação adequada à temperatura ambiente.

Nas mitocôndrias de plantas ocorre um efeito análogo à fotoinibição associada aos cloroplastos, gerando-se também um excesso de espécies reativas de oxigênio (ROS) devido à redução de ATP e a mudanças no fluxo de Ca^{2+} . As espécies reativas de oxigênio atuam indiretamente como sinais entre plastídeos e núcleo desempenhando um papel importante em mecanismos de morte celular programada [Foyer *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 1997; Jabs, 1999; Jones 2000]. Neste contexto, quando ocorre um consumo súbito de energia ou uma falha energética em resultado de condições termodinamicamente desfavoráveis como por exemplo a exposição a baixas temperaturas pode ser induzida uma morte celular programada que muitas vezes está associada à clorose [Bergman *et al.*, 2000; Tiwari *et al.*, 2002; Green e Reed, 1998].

5. Regulação Epigenética: mecanismos e funções

A palavra epigenética deriva do grego "*epi*" que significa "em cima" e genética que significa "envolvendo genes" [Jablonka e Lamb, 2002]. O termo foi introduzido pela primeira vez por Conrad Waddington [Waddington, 1942] no contexto da biologia do desenvolvimento, tendo sido nessa altura utilizada uma metáfora visual para descrever uma “paisagem epigenética” (Figura 2) [Goldberg *et al.*, 2007]. Mais recentemente, Allis *et al.*, (2007) introduziu uma definição molecular de epigenética referindo-se ao estudo de alterações ao nível da transcrição de genes associadas à estrutura da cromatina, não sendo portanto atribuídas a alterações na sequência do DNA. O termo epimutação refere-se a uma alteração de atividade genética transmitida entre gerações devido a modificação químicas ao nível do DNA e não à ocorrência de mutações na sequência do DNA [Holliday *et al.*, 1987], por outras palavras envolve uma transmissão meiótica e/ou mitótica, de marcas epigenéticas, em vez de transmissão de variantes de DNA [Oey e Whitelaw, 2014].

A regulação epigenética refere-se à modulação da atividade de genes através de modificações químicas do DNA e das histonas associadas ao DNA relacionando-se com a estrutura tridimensional da cromatina. Os mecanismos de regulação epigenética são fulcrais na regulação da expressão de genes e terão muito provavelmente surgido como mecanismos de defesa do genoma perante potenciais DNAs “parasitas”, transposões e vírus [Groudine *et al.*, 1981; Miura *et al.*, 2001]. A interação entre os mecanismos epigenéticos entre si, metilação do DNA, modificações de histonas, organização 3D da cromatina e pequenos RNAs, assim como o seu impacto na regulação da expressão de genes não é ainda bem compreendida.

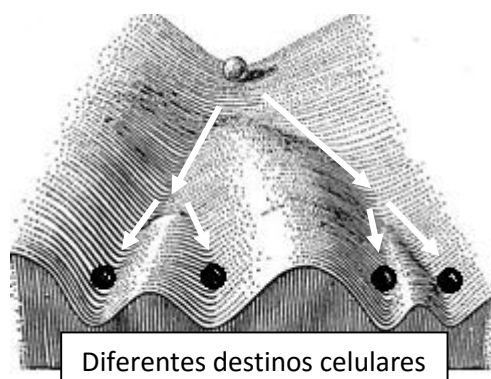


Figura 2 – Paisagem epigenética descrita por Waddington (1942). Imagem adaptada de Waddington *et al.*, (1957).

i. Flexibilidade da estrutura da cromatina

Em eucariotas, a informação genética é codificada pelo DNA, cujo comprimento pode ser de vários metros. O “empacotamento” do DNA num espaço restrito como o núcleo tridimensional exige um elevado nível de compactação e de organização do DNA associado às histonas que no seu conjunto constitui a estrutura da cromatina. O nucleossoma é a unidade fundamental da cromatina e é composto por um octâmero de histonas nucleares (proteínas) e o respetivo DNA genómico que se lhe liga com duas voltas completas. Adicionalmente, o DNA *linker* permite a ligação entre nucleossomas adjacentes [Kornberg *et al.*, 1974; Kornberg *et al.*, 1981; Kornberg e Klug, 1981; Zhou *et al.*, 2013]. Todas as histonas apresentam um C-terminal interno, e um N-terminal acessível, e interagem com o DNA através de pontes de hidrogénio e pontes salinas. Estas ligações fracas permitem que a interação octâmero-DNA seja maleável, e portanto os centros nucleossomais podem reposicionar-se, ou haver mesmo separação entre os dois facilitando a atividade transcricional [Clarke *et al.*, 1993].

Na cromatina, os nucleossomas funcionam como reguladores da expressão genética, quer seja através do recrutamento ou competição com fatores de transcrição, quer pela mudança conformacional e estrutural da cromatina [Nicodemi e Pombo, 2014] e/ou de acessibilidade da dupla cadeia de DNA genómico [Belmont *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2007]. Quando a cromatina se encontra descompactada denomina-se de eucromatina, sendo este um estado permissivo de transcrição ativa em que os nucleossomas se encontram presumivelmente mais afastados uns dos outros; por outro lado, quando a cromatina se encontra compactada, é denominada de heterocromatina, estando os nucleossomas mais próximos uns dos outros, impedindo a transcrição de uma forma geral (Figura 3). Os nucleossomas atuam também como complexos protetores da cromatina, induzindo a sua compactação ou descompactação face a determinados estímulos, tais como stresses bióticos ou abióticos que possam afetar o DNA genómico e tem ainda um papel importante na regulação do ciclo circadiano, ciclo celular e do stress hidrodinâmico da cromatina

[Kim *et al.*, 2015; Hayashi-Takanaka *et al.*, 2009; Fuchs *et al.*, 2006; Sahar e Sassone-Corsi, 2013; Bruinsma *et al.*, 2014; Jarillo *et al.*, 2009].

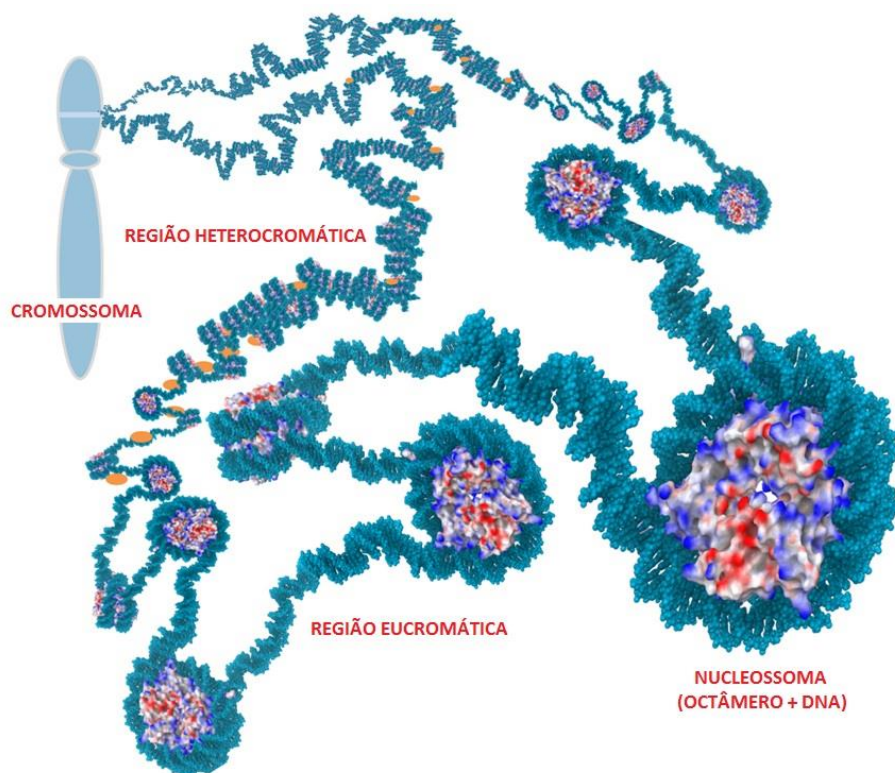


Figura 3 – Organização estrutural da cromatina. Estão representados diferentes níveis de compactação da cromatina [adaptada de Konsta *et al.*, (2014)].

ii. Modificações de histonas

As histonas são proteínas básicas com um domínio globular C-terminal e uma cauda N-flexível. É no N-terminal das cadeias peptídicas histónicas que ocorrem modificações pós-tradução (PTMs) ao nível de resíduos específicos tais como acetilação, metilação, fosforilação ou ubiquitinação [Li *et al.*, 2007]. Estas modificações estão associadas a diferentes estados de compactação/descompactação da cromatina, permitindo respostas mais direcionadas, dependendo do conjunto de modificações [Jarillo *et al.*, 2009; Roy *et al.*, 2014; Jasencáková *et al.*, 2000; Kouzarides *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2007]. As alterações na estrutura de nucleossomas através de combinações de variantes histónicas e de modificações covalentes do N-terminal destas proteínas, por acetilação, metilação, fosforilação, ubiquitinação, biotinylation, SUMOilação, ou glutationilação, constituem no seu conjunto um código histónico [Bannister e Kouzarides., 2011; Jayani *et al.*, 2010; Jenuwein e Allis, 2001; Strahl e Allis, 2000; Winter e Fischle, 2010; Zhou, 2009; Hartl e Finkemeier, 2012]. O “código de histonas” foi originalmente proposto por Jenuwein e Allis (2001) e refere-se às diferentes combinações específicas de variantes de histonas e de

PTMs que desempenham um papel chave na modulação da organização da cromatina e consequentemente na regulação da expressão de genes [Strahl e Allis, 2000; Jenuwein e Allis, 2001; Berger *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2010] influenciando por exemplo, a acessibilidade ou a ligação de fatores de transcrição ou atuando como sinais moleculares que facilitam o recrutamento de complexos remodeladores da cromatina [Clarke *et al.*, 1993; Lennartsson *et al.*, 2009; Zucchi *et al.*, 2012; Fuchs *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2012; Chua *et al.*, 2001; Cosgrove *et al.*, 2006; Mellor *et al.*, 2006; Jung *et al.*, 2014; Bruinsma *et al.*, 2014; Santos *et al.*, 2011].

As modificações pós-traducionais são mediadas por enzimas epigenéticas que regulam o código histónico e consequentemente alteram o estado de compactação da cromatina, de forma a favorecer, ou não, a interação da dupla cadeia de DNA com os agentes de mecanismos de transcrição genética. Têm sido caracterizadas várias enzimas envolvidas na modificação de histonas. As acetiltransferases de histonas (HATs) têm uma especificidade relativamente baixa, uma vez que cada enzima pode modificar vários resíduos de lisina diferentes, embora algumas possam estar especificamente limitadas a determinados resíduos [Kouzarides *et al.*, 2007]. Em contraste, as metiltransferases (HMTs) apresentam elevada especificidade podendo ocorrer uma única modificação de lisina ao nível de uma única histona [Bannister e Kouzarides, 2005]. As acetiltransferases, desacetilases (HDACs), metiltransferases (HMTs) e desmetilases (HDMS) de histonas foram isoladas ou identificadas em várias plantas incluindo *Arabidopsis thaliana*, tomate (*Solanum lycopersicum*), arroz (*Oryza sativa*), cevada (*Hordeum vulgare*), videira (*Vitis vinifera*), couve (*Brassica oleracea*) e *Brachypodium distachyon* mas ainda assim, o significado funcional desses modificadores não é claramente compreendido [Zhao *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2012; Braszewska-Zalewska *et al.*, 2013; Aquea *et al.*, 2010; Papaefthimiou e Tsiftaris, 2012].

A acetilação dos resíduos de lisina está associada a um aumento do potencial eletroquímico das histonas enfraquecendo a força de ligação entre histonas e DNA tornando assim a cromatina mais “relaxada” e por isso facilitadora da atividade transcricional. A diminuição da força de interação entre o centro nucleossomal e o DNA faz com que esta modificação esteja geralmente associada a um aumento da expressão genética. A glutationilação histónica em resíduos de cisteína por outro lado é uma marca pós-translacional histónica que atua como sinal redox entre mitocôndrias e núcleo celular [Hartl e Finkemeier, 2012]. As espécies reativas de oxigénio estão continuamente a ser criadas como produto secundário da respiração, e atuam como base para o estado energético celular, assim como na identificação de stresses que possam atuar sobre o estado redox mitocondrial. As espécies reativas de oxigénio, a glutationa, a glutationilação histónica e a sua transmissibilidade mitocôndria-núcleo atuam como ponte para o reconhecimento necessário à indução da alteração de estado da cromatina, como resposta a eventuais estímulos [Hartl e Finkemeier, 2012]. A acetilação da lisina 5, a mais próxima do N-terminal, da histona 4 (H4K5ac), é normalmente tida como uma referência pois existe em genes importantes na definição da especificidade celular impedindo a compactação destas regiões da cromatina durante

a mitose e assegurando uma transcrição rápida [Zhao *et al.*, 2011]. De uma forma geral, a acetilação de histonas tem efeitos regulatórios em vários processos metabólicos e de desenvolvimento [Close *et al.*, 2010; Xing e Poirier, 2012]. A acetilação de lisinas está por exemplo envolvida na homeostase energética e na regulação do fluxo carbônico, existindo uma elevada correlação com estados de cromatina permissivos. A título de exemplo, as marcas H4K5 e H4K12 são passíveis de ser transmitidas durante a mitose e estão envolvidas no recrutamento de um bromodomínio (BRD4) que leva a uma descompactação da cromatina, que por sua vez está associada a ativação transcricional [Zhao *et al.*, 2011]. Em animais, a marca H4K5ac tem sido relacionada com a expressão de genes expressos durante a aprendizagem em ratos [Park *et al.*, 2013]. Em *Arabidopsis*, a marca H4K5ac apresenta maior predominância entre o meristema e a região de alongação (interface de diferenciação) e, ao nível da região de alongação apresentou-se maioritariamente presente em tecidos vasculares sugerindo a relação da H4K5ac com a diferenciação celular [Braszewska-Zalewska *et al.*, 2013]. Por outro lado existem resíduos que podem ser acetilados ou metilados, tal como a marca H3K9 (lisina 9 da histona 3). A acetilação da H3K9 é uma modificação bastante importante, estando essencialmente relacionada com promotores de genes ativos [Kurdistani *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2005]. A H3K9ac também apresenta elevada correlação com a H3K14ac e com a H3K4me3 (lisina trimetilada), sendo estas marcas particularmente associadas a promotores de genes ativos em ratos [Karmodiya *et al.*, 2012]. Apesar da sua versão monometilada (H3K9me1) estar enriquecida no sítio do início de transcrição de genes ativos, este resíduo tem ainda versões di e trimetiladas encontradas em genes silenciados [Barski *et al.*, 2007]. De uma forma geral, a metilação de H3K9 é tida como uma marca heterocromática associada a cromatina transcricionalmente inativa.

iii. Metilação do DNA

A metilação de DNA foi primeiramente teorizada por Hotchkiss (1948) com a descoberta da 5-metilcitosina (5mC) e consiste na ligação de um grupo metilo (-CH₃) ao carbono 5 do anel de citosina (5mC). A 5mC é uma marca epigenética presente em animais, plantas e fungos sendo encontrada maioritariamente em contexto simétrico CpG e CpHpG. No caso particular das plantas, a metilação do DNA pode ocorrer também em contexto assimétrico CHH em que H = A, C, ou T. Parte da atribuição de grupos metilo a citosinas depende de enzimas que os transferem da S-adenil metionina (SAM) para o quinto carbono destas, formando a 5mC. A metilação de SAM pode ser mediada por ATP ou por MAT1A, dependendo esta última do equilíbrio redox da glutatona (GSH/GSSG) [García-Gímenes e Pallardó, 2014; Niedzwiecki *et al.*, 2013]. A glutatona é um péptido com três resíduos, geralmente associado à transferência e manutenção do potencial redox para a homeostase celular. Ainda está por caracterizar a correlação entre o equilíbrio redox da glutatona e eventuais alterações em marcas epigenéticas, quer sejam metilação de DNA ou modificações pós-translacionais histónicas.

O estabelecimento de metilação do DNA envolve as metiltransferases de DNA (MTases) que são responsáveis pela ligação de grupos metilo a citosinas. Há quatro famílias principais de MTases de plantas identificadas e com funções distintas, nomeadamente *de novo* e/ou metilação de manutenção, DRM (*domains rearranged methylases*), MET1 (*methylase 1*), CMT (*chromomethyltransferase*) e o homólogo de metiltransferase de DNA 2 (Dnmt2) [Zhang *et al.*, 2010]. O padrão de metilação do DNA pode também ser editado, via *de novo* metilação ou desmetilação. Em mamíferos, algumas metiltransferases de DNA (ou DNMT) permitem o estabelecimento de novos padrões de metilação do DNA e são portanto denominadas por *de novo* DNMTs. Por outro lado, existem DNMTs que funcionam durante a replicação de DNA, copiando padrões de metilação da cadeia parental, para a cadeia recém-sintetizada. Ambos os grupos de DNMTs estão envolvidos, em grande extensão, no desenvolvimento do embrião em mamíferos [Lan *et al.*, 2013]. Quando as células atingem o término de diferenciação, a expressão destas enzimas é bastante reduzida, sugerindo que o padrão de metilação de DNA celular pós-mitótico seja estável [Moore *et al.*, 2012]. A desmetilação de DNA pode ocorrer de forma passiva ou ativa. A desmetilação passiva ocorre durante a replicação de DNA, em que as citosinas metiladas são trocadas por outras sem marcas; a desmetilação ativa envolve o mecanismo de reparação de DNA, com a excisão de bases mediada por glicosilases de DNA, sem que ocorra a replicação de DNA [Ikeda e Kinoshita, 2008].

O significado funcional da metilação do DNA na regulação da expressão de genes foi inicialmente sugerida por Holliday & Pugh, 1975. A metilação do DNA está envolvida no silenciamento de retrovírus, elementos transponíveis, transgenes, inativação do cromossoma X em fêmeas de mamíferos sendo um interveniente fulcral na regulação da expressão de genes [Groudine *et al.*, 1981; Miura *et al.*, 2001; Matzke *et al.*, 1996; Allen *et al.*, 1992]. A metilação

do DNA, quando localizada em regiões promotoras de genes, é geralmente uma marca associada à repressão de genes [Suzuki e Bird, 2008]. O significado da presença de metilação ao nível de regiões codificantes é ainda pouco claro. A presença de metilação ao nível de regiões codificantes tem sido referida como compatível com a transcrição de genes [Zhang *et al.*, 2006; Zilberman *et al.*, 2007, Zhang *et al.*, 2008].

Outro caso de influência na metilação de DNA é o da metilação direcionada por RNA (RdDM ou *RNA-directed DNA methylation*), mais concretamente siRNAs (pequenos RNAs de interferência). Existem percursos metabólicos complexos, que geram siRNA homólogos a sequências repetidas, que direcionam a atividade da metiltransferase de citosinas em *Oryza sativa* (OsDRM2, *domains rearranged methyltransferase 2*). Sabe-se que esta enzima é uma das mais importantes metiltransferases *de novo* que atua sobre todos os três grupos de citosinas mencionados [Sharma *et al.*, 2009; Moritoh *et al.*, 2012]. Henderson *et al.*, (2010) demonstrou, por mutagénesis direcionada em *Arabidopsis thaliana* que a OsDRM2 necessita do domínio N-terminal UBA, um motivo proteico comum em eucariotas, com dois *loops* conservados que interagem com proteínas da via de ubiquitinação, e que está associado à reparação de excisão por UV do DNA, e à sinalização celular por via de cinases proteicas [Kozlov *et al.*, 2007; Mueller e Feigon, 2002] e também da OsDRM3 como promotor para a manutenção da metilação direcionada por RNA de grupos CG não-metilados. A OsDRM3 é um parálogo da OsDRM2, com um centro catalítico mutado e expressão independente desta. A OsDRM2 actua então sob forma de complexo na remoção de siRNA e atribuição de metilação, impedindo ou induzindo a atividade de RNA/DNA polimerases tal como proposto por Dangwal *et al.* (2013). Ambos os domínios UBA (N-terminal) e da metiltransferase (C-terminal) da DRM2, assim como siRNA (24 nt) e a DRM3, são necessários para a correta atividade de metilação desta epi-enzima [Henderson *et al.*, 2010]. O domínio UBA poderá estar envolvido no reconhecimento da DRM2 por parte de outras enzimas, potencialmente indicando estados específicos da cromatina [Henderson *et al.*, 2010]. O domínio UBA de OsDRM2 poderá também funcionar como ponto de complexação com o fator de iniciação da transcrição eIF4A [Grifo *et al.*, 1982; von der Haar *et al.*, 2002; Abdelhaleem *et al.*, 2003] que poderá funcionar como regulador da *de novo* metiltransferase sendo provavelmente uma regulação conjunta [Dangwal *et al.*, 2013]. As metiltransferases OsDRM2 e OsDRM3 apresentam níveis semelhantes de expressão e são duplamente expressas no meristema apical caulinar e nos primórdios do desenvolvimento da panícula de arroz no entanto, existe uma diminuição da expressão quando as plantas são submetidas a um *stress* de frio [Sharma *et al.*, 2009]. Em arroz, a perda de OsDRM2 induz a aparentes anormalidades fenotípicas como sendo um crescimento debilitado [Moritoh *et al.*, 2012; Ferreira *et al.*, 2015] enquanto em *Arabidopsis*, a perda de AtDRM1 ou de AtDRM2 não parece evidenciar efeitos notórios ao nível de fenótipo [Cao e Jacobsen, 2002; Wada *et al.*, 2003].

iv. Conexões entre metilação do DNA e modificações histônicas

Pouco se sabe sobre a ligação ou transferência de marcas epigenéticas entre histonas e DNA. A marca H3K9meX ($X > 1$) parece atuar como transferidor de metilação entre moléculas, estando já associada a vários mecanismos de compactação e inativação de cromatina em mamíferos [Rougeulle *et al.*, 2004; Escamilla-Del-Arenal *et al.*, 2013]. Por um lado, a H3K9me2 atua como marca de inativação do cromossoma X, ligando a proteína CdyI e a metiltransferase G9a, atuando assim na propagação desta marca histônica durante a divisão celular [Escamilla-Del-Arenal *et al.*, 2013]. Por outro lado, a marca H3K9me3 liga HP1 (proteína heterocromática 1) à heterocromatina recrutando depois a metiltransferase 3b que metila *de novo* o DNA [Lehnertz *et al.*, 2003]. Sabe-se também que a metilação de H3K9(me2-3) foi considerada um pré-requisito na metilação de DNA mediada por Suv39h, em *repeats* satélite de heterocromatina pericêntrica em mamíferos [Lehnertz *et al.*, 2003; Qin *et al.*, 2010].

v. Pequenos RNAs não-codificantes (ncRNAs)

Os pequenos ncRNAs (não-codificantes), mais concretamente micro-RNAs (miRNAs) e pequenos RNAs de interferência (siRNAs) desempenham funções repressoras na expressão de genes em animais e plantas [Ghildiyal e Zamore, 2009]. Em plantas, os miRNAs têm comprimentos de aproximadamente 21 nts, e derivam de transcritos primários mais longos (miRNA) [Voinment *et al.*, 2009; Ding *et al.*, 2012]. Os miRNAs reconhecem os mRNA (RNA mensageiro) alvo através de complementação de sequências imperfeitas. O RISC (ou complexo de silenciamento induzido por RNA) que contém miRNA/siRNA induz o silenciamento genético pós-transcricional através da clivagem, ou corte, do mRNA e repressão translacional [Sunkar *et al.*, 2012]. Em arroz, vários miRNA regulados pelo frio foram já identificados mas ainda se conhece pouco sobre os genes-alvo de miRNA, cujos níveis de expressão são regulados pelo frio [Lv *et al.*, 2010].

6. Ferramentas de análise de padrões epigenéticos

Atualmente estão disponíveis várias técnicas passíveis de ser usadas para decifrar marcas epigenéticas quer ao nível de genes específicos [Haring *et al.*, 2007] quer ao nível epigenómico global [Valouev *et al.*, 2008; Zentner e Henikoff, 2014]. Uma das técnicas comumente utilizadas na análise epigenética é a imunoprecipitação da cromatina (ChIP, ChIP-chip, ChIP-seq ou *High Throughput* ChIP) que se baseia na identificação de marcas histônicas ou de DNA através da sua seleção com anticorpos. A técnica de ChIP permite isolar fragmentos de cromatina que

tenham marcas, ou grupos funcionais específicos, através da sua seleção por adsorção a anticorpos posteriormente separados/decantados com *beads* de agarose [Haring et al., 2007]. Este processo ajuda a compreender em que região da dupla cadeia de DNA se encontra a marca alvo e permite adicionalmente identificar marcas na dupla cadeia, ou numa proteína a esta associada, através da utilização de anticorpos específicos para as moléculas a analisar (X-ChIP ou *crosslinked-chromatin immunoprecipitation*). A deteção da região associada à marca de imunoprecipitação é feita através da análise por qPCR, de onde se pode obter uma maior amplificação de DNA caso este exista em solução numa proporção estatisticamente relevante. A fragmentação da cromatina permite assim ter um melhor foco de associação entre marca e “região de DNA” uma vez que, com fragmentos menores, menor será a probabilidade de imunoprecipitar regiões adjacentes à pretendida, e consequentemente obtém-se uma quantificação estatística de presença de marca para uma região mais restrita e específica. O tamanho ideal para os fragmentos está entre os 250 e 300 pares de bases, para que se obtenha uma maior eficiência de imunoprecipitação, e maior distinção de a que região pertence qual marca. A espectrometria de massa com MALDI-TOF (ou *Matrix-Assisted Laser Desorption and Ionisation – Time Of Flight*) é outra técnica que permite a identificação de marcas histónicas permitindo um mapeamento ou sequenciamento de aminoácidos presentes e respetivas modificações pós-translacionais [Villar-Garea et al., 2006].

Relativamente à análise de metilação do DNA, a técnica de conversão do DNA com bissulfito é comumente usada. As citosinas não metiladas são convertidas em uracilos, permitindo assim, com outras técnicas de sequenciação de DNA, determinar padrões de metilação ou de DMRs (*differentially methylated regions*) [Frommer et al., 1992; Li et al., 2012]

No que diz respeito ao mapeamento de nucleossomas, é possível utilizar técnicas como a microscopia eletrónica que permite estudar estados estruturais da cromatina, detetar nucleossomas e respetivas posições com a ajuda de enzimas de restrição no caso de sequências previamente sequenciadas [Brown et al., 2013]. Por outro lado, a digestão da cromatina com a nuclease micrococcal permite que seja feita a digestão de DNA de dupla cadeia deixando os nucleossomas intactos para posterior análise, ou seja é útil para analisar as posições nucleossomais e respetivas modificações, tanto histónicas como no DNA [Brown et al., 2013]. Adicionalmente, o microscópio de força atómica (AFM ou *Atomic Force Microscopy*) permite determinar posições e estabilidades nucleossomais, respetivas forças de ligação histona-DNA, cooperação molecular na ocupação da cadeia de DNA entre outras [Lohr et al., 2007; Davies et al., 2005]. Esta técnica permite também a análise de corrente elétrica no DNA, o que pode vir a adquirir relevância no futuro dado que recentemente Baek et al. (2014) afirmou obter um estado celular pluripotente através de uma reprogramação epigenético-celular na presença de campos eletromagnéticos. Belyaev et al. (2001) demonstrou também que é possível reorganizar a estrutura

da cromatina através da indução de magnetismo de baixa frequência [Desyatnikov *et al.*, 2012; Martinez *et al.*, 2014; Metzler *et al.*, 2004; Reith *et al.*, 2012].

Para além de técnicas físicas de análise, podem ainda ser consideradas abordagens bioquímicas que permitem comparar resultados obtidos em diferentes contextos. A utilização de compostos químicos específicos que interferem com os mecanismos epigenéticos influenciando o padrão das marcas epigenéticas podem contribuir para uma melhor compreensão da influência da plasticidade epigenética na regulação da expressão de genes. A tricostatina A, um ácido hidroxâmico, é uma droga muito potente com a capacidade de inibir as desacetilases histónicas levando a uma hiperacetilação de histonas. Tanto a tricostatina A como o agente hipometilante 5-azacitidina causam um aumento global da acetilação da histona 4 [Yang *et al.*, 2010] induzindo a descondensação de cromatina interfásica [Tóth *et al.*, 2004]. Devido à sua influência na regulação epigenética através da inibição de desacetilases, a tricostatina A tem sido usada no tratamento de alguns tipos de cancro, permitindo controlar a progressão do ciclo celular normal podendo causar apoptose em tecidos específicos [Yamashita *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2000; Papeleu *et al.*, 2003]. Outra técnica bioquímica é o *tagging* de biomoléculas para deteção por fluorescência que permite determinar quantidade relativa e localização *in vivo* e neste contexto, já se produzem sistemas genéticos de expressão transiente que permitem localizar e identificar marcas histónicas *in vivo* [Sato *et al.*, 2013].

II - Objetivos da tese

O presente trabalho tem como foco compreender de que forma o código das histonas pode influenciar a regulação transcricional do gene *OsDREB1B* de arroz (*Oryza sativa*) envolvido na resposta ao *stress* de frio. Especificamente, pretende-se determinar:

- A correlação entre a expressão do gene *OsDREB1B* e marcas pós-translacionais histônicas específicas ao nível de determinadas regiões do promotor do gene em condições controlo (28°C) *versus stress* de frio (4°C);
- O papel de fatores epigenéticos, nomeadamente de enzimas epigenéticas como sendo uma acetiltransferase de histonas (HAT) e uma metiltransferase de DNA (DMT) na regulação do padrão de expressão do gene *OsDREB1B* nomeadamente, perceber qual o impacto que a ausência, destas enzimas na modificação da paisagem epigenética mais concretamente sobre o código histónico do gene de interesse.

O desenho experimental para responder a estas questões passa por estudos funcionais em que se utilizam plantas de arroz com mutações em genes específicos responsáveis pelo estabelecimento de marcas epigenéticas e drogas remodeladoras da cromatina, extensivamente referidas pelo seu papel na alteração de padrões epigenéticos.

III - Materiais e Metodologia

As principais etapas metodológicas do procedimento experimental estão representadas na Figura 4. O desenho experimental envolveu (1) o crescimento das plantas, selvagem e mutantes, em condições controlo (28°C) e de *stress* de frio (4°C); (2) a realização de estudos expressão do gene *OsDREB1B* (qPCR) e (3) imunoprecipitação da cromatina (ChIP) para estudar o padrão de marcas de histonas ao nível do promotor do gene *OsDREB1B*.

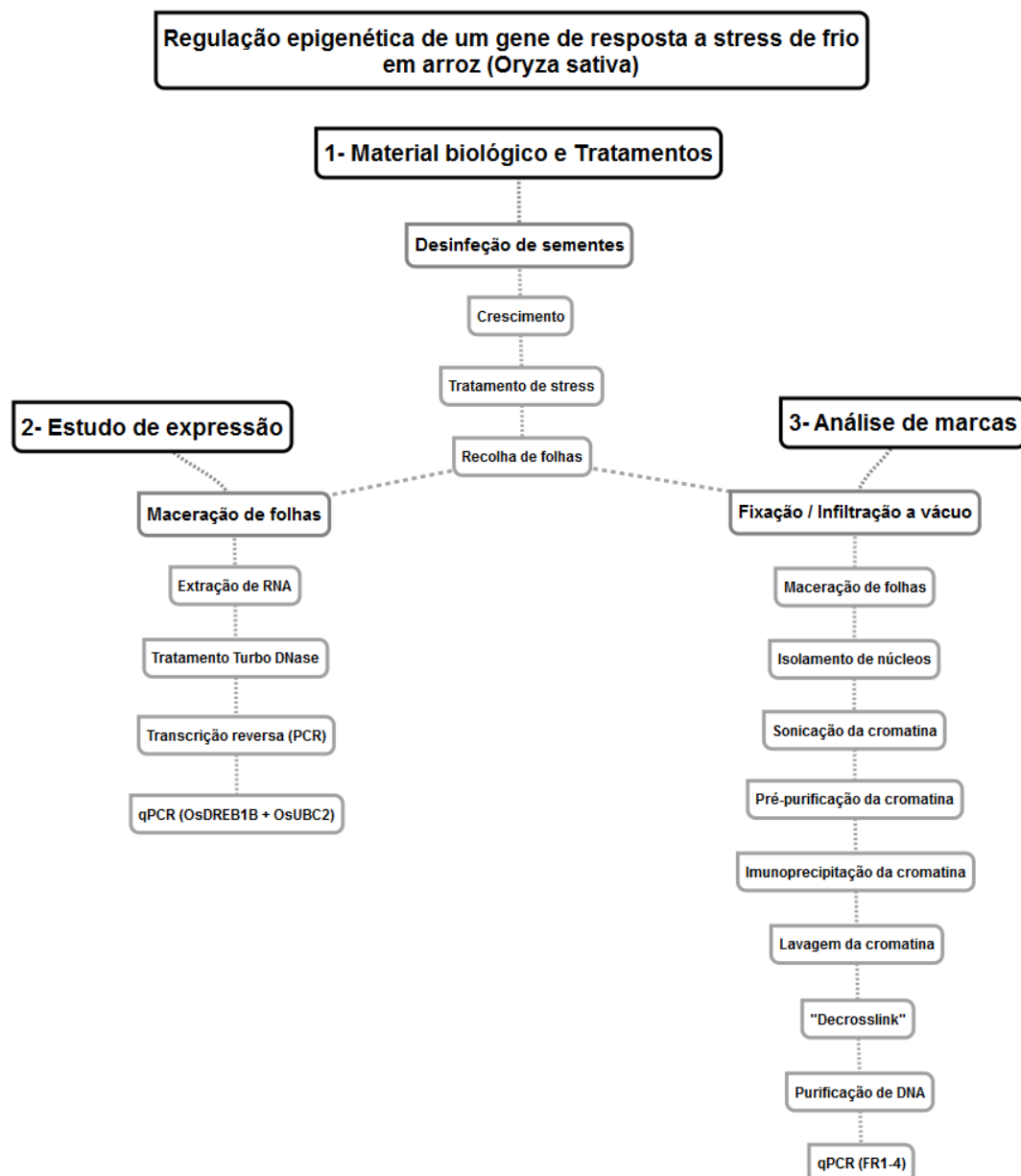


Figura 4 - Etapas do processo experimental subjacente ao presente trabalho: (1) selecção do material biológico, esterilização e germinação das sementes, crescimento das plantas e imposição de stress; (2) estudos de expressão e (3) imunoprecipitação da cromatina.

1. Material biológico

As sementes de *Oryza sativa* L. cv. Nipponbare são propagadas e mantidas no grupo de Genômica de Plantas em Stress (GPlantS). As sementes de arroz com mutações para moduladores epigenéticos foram originalmente desenvolvidas por Gynheung An (Kyung Hee University, Crop Biotech Institute, Korea). Neste trabalho foram usadas T-DNA *insertion lines* com mutações específicas para uma acetiltransferase de histonas (HAC704) e uma metiltransferase de DNA (DMT706). A variedade Dongjin foi também usada uma vez que representa o “*wild-type*” a partir de onde foram originadas as mutações.

A esterilização de sementes envolveu uma lavagem com benlato/carbendazim (1 g/l) durante 30 minutos, a 50 °C, com agitação e outra com 70% etanol durante 1 minuto seguida de uma passagem por água para remover o álcool; uma outra lavagem foi realizada com 50% lixívia e duas gotas de Tween20 (ou polissorbato 20 - Thermofisher) durante 30 minutos com agitação, seguida de várias passagens por água para remover o detergente, a lixívia, e/ou benlato que possam ter precipitado na superfície das sementes. As últimas lavagens com água foram sucessivamente repetidas até deixar de aparecer espuma à superfície. As sementes desinfetadas foram em seguida colocadas em água bidestilada, numa câmara escura, a 28 °C, durante aproximadamente três dias para germinar.

2. Imposição do *stress* de frio

As plântulas germinadas foram transferidas para tubos, num sistema hidropônico contendo meio nutritivo [Yoshida *et al.*, 1976] sob condições controladas até aos 13 dias pós-germinação, especificamente a 28 °C, com ciclos de luz/escurecimento de 12/12h, com intensidades de 200 ou 500 $\mu\text{mol fotões.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e com 60% de humidade. No décimo quarto dia, passadas 4 horas do início do dia (ou das 12h de luz, caso não estejam sincronizados) metade das plantas foram transferidas para a câmara com condições de *stress* de frio (4 °C, 200 $\mu\text{mol fotões.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). As plantas sob *stress* de frio foram mantidas nestas condições durante 4h (aproximadamente 8h depois do início de incidência luminosa) após as quais se recolheram as folhas e se descartou o restante material biológico. A recolha das folhas foi feita, cortando em pedaços de 1 a 2 cm de comprimento, imediatamente congeladas em azoto líquido e mantidas a -80°C até serem usadas para estudos de expressão. Para o processo de imunoprecipitação da cromatina as folhas são recolhidas e submetidas de imediato ao processo de infiltração com vácuo tal como descrito mais à frente no ponto (5) relativo ao procedimento de ChIP.

3. Aplicação de drogas remodeladoras da cromatina

O tratamento com drogas remodeladoras da cromatina foi efetuado durante os três últimos dias de crescimento das plântulas em meio Yoshida. Os compostos químicos utilizados foram a Tricostatina A (TSA) que causa hiperacetilação das histonas e a 5-azacitidina (5-AC) que induz a hipometilação global do DNA [Santos *et al.*, 2011]. No ensaio de controle as plântulas foram nutridas apenas com meio Yoshida esterilizado simples. Para o ensaio com 5-AC, as plântulas foram tratadas durante 3 dias com meio Yoshida suplementado com 5-azacitidina (80 μ M) a partir do 11º dia após a germinação, sendo a solução de 5-AC renovada diariamente dado estar descrita a instabilidade desta droga em solução [Walker *et al.*, 2012]. Para o ensaio com TSA, o meio Yoshida foi suplementado com TSA a 15 μ M sendo as plântulas tratadas durante 3 dias também no 11º dia após a germinação [Santos *et al.*, 2002].

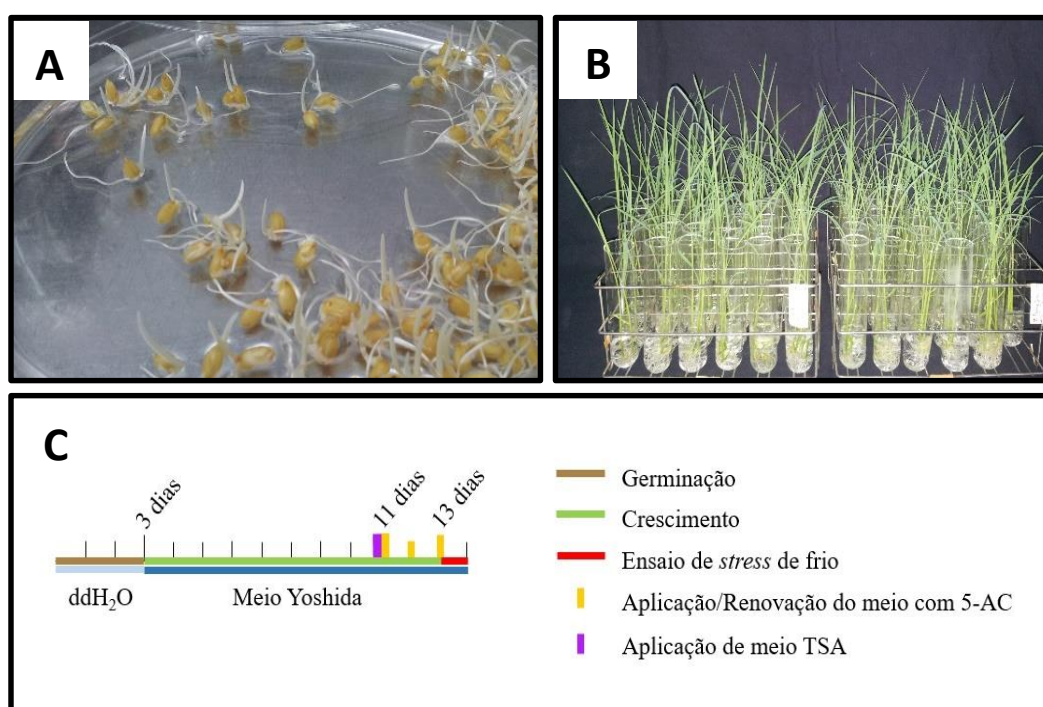


Figura 5 – Germinação, crescimento e imposição de tratamentos. Sementes após três dias de germinação (A); Plântulas de arroz com 13 dias de crescimento (B); Ensaios e tratamentos efetuados (C).

4. Estudos de Expressão

i. Extração, purificação e quantificação de RNA

O procedimento para a extração de RNA seguiu as instruções do fabricante (Zymo Research). A partir dos diferentes ensaios (controle, *stress* de frio e drogas) foram recolhidas folhas para um falcon que foram imediatamente congeladas em azoto líquido (N₂) e guardadas a -80°C até serem maceradas. Após maceração em azoto líquido, utilizou-se aproximadamente 50 mg de macerado por amostra e adicionou-se-lhe pelo menos 500 µl de TRI Reagent. A solução foi misturada por acção mecânica (vórtex), centrifugada a 12.000g durante 1 minuto e em seguida transferiu-se o sobrenadante para um tubo RNase-free, onde se adicionou também 1 equivalente de etanol (95-100%) e se misturou com vortex tal como antes. Passou-se a mistura para uma coluna Zymo-Spin IIC e centrifugou-se-a a solução a 10.000-16.000g durante 1 minuto. Transferiu-se a coluna Zymo-Spin IIC para um novo tubo, adicionou-se 400 µl de Direct-zol RNA PreWash e repetiu-se a centrifugação. Descartou-se o eluído e repetiu-se o passo anterior de lavagem com Direct-zol RNA PreWash. Após o primeiro passo de lavagem, adicionou-se 700 µl de RNA Wash Tampão e repetiu-se a centrifugação e descarte do eluído. Para garantir a remoção completa do tampão de lavagem centrifugou-se outra vez, durante 2 minutos, para um tubo novo. Transferiu-se a coluna para um *RNase-free eppendorf*, e adicionou-se-lhe 50 µl de água livre de DNases/RNases. Dois minutos após a adição da água, à temperatura ambiente, voltou-se a centrifugar durante 1 minuto para recolher a amostra de RNA. Este processo foi repetido, em paralelo, para todas as amostras. A cada amostra de RNA anteriormente obtida adicionou-se 5 µl de 10x Tampão e 1 µl de Turbo DNase, e agitou-se suavemente. A mistura foi de seguida incubada a 37 °C durante 30 minutos, após a qual se adicionou 5 µl de DNase Inactivation Reagent e se voltou a agitar suavemente. Após uma incubação de 5 min à temperatura ambiente, centrifugou-se a solução durante 2 minutos a 6.000g, e recolheu-se o sobrenadante para um novo tubo. A integridade do RNA foi avaliada através de electroforese. Para tal, aplicou-se 10 µl da seguinte mistura (4 µl de amostra - original, ou diluída 10 vezes – 2 µl de RNA Loading Buffer e 6 µl de água milli-Q) em gel de 1% agarose (nzytech). A corrida foi feita com correntes de 100 a 120 V e em tampão 1x TAE. Para determinar a concentração de RNA utilizou-se o nanodrop ND-2000C, no qual se aplicou um mínimo de 2 µl de amostra em triplicado. A quantificação de RNA foi feita com uma diluição de 10 vezes da amostra original, de forma a obter uma absorvância adequada (nunca acima de 1.4).

ii. Síntese de cDNA

A síntese de cDNA foi efetuada de acordo com as instruções constantes no kit “Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis” (Roche). O primeiro passo consistiu em adicionar 2 µg de RNA (volume calculado segundo a concentração determinada) a 1 µl de Anchored-oligo(dT)18 Primer aferindo-se com água (milli-Q) até um volume total de 11,4 µl. Incubou-se a amostra durante 10 minutos a 65 °C e arrefeceu-se imediatamente a seguir em gelo. Ao tubo anterior adicionaram-se 4 µl de “Transcriptor High Fidelity Reverse Transcriptase Reaction”, 0,5 µl de “Protector RNase Inhibitor”, 2 µl de “Deoxynucleotide Mix”, 1 µl de DTT e 1,1 µl de “Transcriptor High Fidelity Reverse Transcriptase”. O volume total final deverá ser sempre de 20 µl. Misturou-se suavemente e incubou-se a mistura de reacção a 55 °C durante 30 minutos. De seguida elevou-se a temperatura da mistura aos 85 °C de forma a inactivar a transcriptase reversa.

iii. Quantificação relativa de transcritos (qPCR)

A análise foi feita com um Lightcycler 480 II, com Lightcycler 480 SYBR Green I Master mix (Roche). Todas as amostras foram analisadas em triplicado, aplicando 5 µl de amostra, 1 µl de cada primer (1,25 µM cada), 3 µl de água milli-Q (Roche) e 10 µl de SYBR Green. Utilizaram-se os seguintes pares de primers: 5'-CCAGAAATTGGGGGAAAAA-3' e 5'-GGAATCACAAAAGGAGGGAGA-3' para o gene de interesse (*OsDREB1B* - LOC_Os09g35010), e 5'-TTGCATTCTCTATTCCTGAGCA -3' e 5'-CAGGCAAATCTCACCTGTCTT-3' para o gene de controlo (*ubiquitin-conjugating enzyme E2* ou *OsUBC2* - LOC_Os02g42314).

Foi, portanto, aplicado um volume de 20 µl de mistura de reacção em cada poço da placa de PCR. Por corrida aplicou-se um controlo com 5 µl de água milli-Q (Roche) em vez de amostra. As condições para as corridas de qPCR foram as seguintes: 95 °C durante 5 minutos, seguido de 45 ciclos de amplificação com 95 °C por 10 s, 58 °C por 10 s e 72 °C por mais 10 s. Para todas as análises, usou-se uma temperatura de amplificação de 58 °C.

Fez-se também uma análise de diluições seriadas, de uma amostra de DNA genómico (1/10, 1/100, 1/400, 1/800 e 1/8000 aplicadas como amostras, 5 µl num total de 20 µl de mistura, em triplicado). Esta análise de diluições foi feita para calcular a eficiência de amplificação do par de primers utilizado, permitindo calcular a concentração de DNA (previamente mRNA).

A título explicativo, utilizou-se a velocidade de amplificação da série de diluições, da amostra com concentração de DNA conhecida, para seleccionar as amostras com menor erro de Ct (limite de amplificação - valor adimensional que representa a velocidade de amplificação de sinal captado pelo espectrofotómetro). Os valores de Ct seleccionados ficaram sempre entre 22 e 34 unidades para garantir o menor erro devido a absorção de luz excessiva por parte da amostra (Ct < 22) e para evitar flutuações de analito na solução durante a análise com o espectrofotómetro (Ct

> 34). Aplicou-se aos Ct obtidos com as diluições, uma regressão linear que nos permitiu calcular a eficiência dos primers usados de acordo com a fórmula $\text{Eficiência} = 10^{(-1/\text{declive da regressão linear})} - 1$.

Esta eficiência, aplicável para amostras com Ct incluídos entre os das diluições selecionadas, foi usada para calcular a concentração inicial de DNA presente em amostras com concentração previamente desconhecida, através da velocidade de amplificação, ou Ct, obtida para cada uma das amostras analisadas [Ramaker *et al.*, 2003]. A eficiência calculada foi apenas usada para o respetivo par de primers e em misturas semelhantes, pois a amplificação poderia ser inibida por diferentes concentrações de sais, ou outros solutos presentes, resultando em diferentes velocidades de amplificação e, conseqüentemente, maior erro na determinação da concentração de DNA inicial. O valor de Ct de cada amostra foi então usado, tal como exposto na fórmula $C_{\text{DNA}} = (\text{Eficiência} + 1)^{-Ct}$, para calcular a concentração de DNA existente.

Posteriormente, para cada amostra, comparando os valores de limite de amplificação/*threshold* (Ct) do gene de interesse (*OsDREB1B*) com os de um gene constitutivo normalizador “*housekeeping gene*”, que no presente estudo foi o gene *OsUBC2*, é possível determinar a variação do número de transcritos do gene-alvo em diferentes amostras. Isto foi possível porque o gene normalizador apresenta uma expressão constante e estável para as condições em estudo [Zhiguo *et al.*, 2015].

5. Imunoprecipitação da cromatina (ChIP)

A técnica de imunoprecipitação da cromatina (ChIP) permite analisar o padrão de marcas específicas de modificações das histonas potencialmente correlacionáveis com a estrutura da cromatina. De uma forma sucinta na técnica de ChIP as histonas associadas ao DNA in vivo são covalentemente “*crosslinked*” ao DNA através de um processo de infiltração por vácuo de tecidos da planta com formaldeído. De seguida, a cromatina é isolada, fragmentada e os complexos DNA-proteína são imunoprecipitados com anticorpos específicos comercialmente disponíveis. Os procedimentos experimentais inerentes ao processo de ChIP são detalhadamente descritos a seguir.

i. Otimização do processo de ChIP através de ensaio FAIRE

Previamente à análise de marcas histónicas com ChIP fizeram-se dois ensaios FAIRE (*Formaldehyde-Assisted Isolation of Regulatory Elements*) para comparar métodos de fixação da cromatina e respectivas eficiências. Esta experiência permite otimizar o método de modo a obter um compromisso entre a fixação e posterior recuperação de DNA da cromatina. O primeiro ensaio FAIRE foi realizado com amostras infiltradas com 0.8 e 1 % de formaldeído, em tampão A (0,8% v/v de p-formaldeído, butirato de sódio 10mM, sucrose 0.4M, Tris (pH8) 10mM, β -mercaptoetanol 5mM e PMSF 0.1mM, Anexo I). O segundo ensaio foi realizado com amostras infiltradas com 0.8 % de formaldeído em tampão A, mas em que as amostras de tecidos foliares foram recolhidas de plântulas crescidas a 28 °C (controlo) ou 4 °C (stress de frio). Para cada ensaio ter-se-ão portanto seis amostras diferentes: FAIRE 1 (H_2O_x , 0.8 % $_x$ e 1 % $_x$ e respectivas incubadas $H_2O_{65^\circ C}$, 0.8 % $_{65^\circ C}$ e 1 % $_{65^\circ C}$) e FAIRE 2 (H_2O_x , 28 °C $_x$ e 4 °C $_x$, e respectivas incubadas $H_2O_{65^\circ C}$, 28 °C $_{65^\circ C}$ e 4 °C $_{65^\circ C}$). Em ambos os ensaios infiltraram-se também folhas com tampão A sem formaldeído que funcionou como controlo no processo de infiltração/fixação. Utilizou-se, aproximadamente, 100 mg de cada uma das amostras maceradas e ressuspendeu-se em 1 ml de Tampão G (Tris (pH 6.8) 62.5mM, NaCl 0.2M, SDS 2% (m/V) e DTT 10mM, Anexo I). Agitou-se a ressuspensão durante 1 minuto e centrifugou-se durante 5 minutos a 13.000 rpm à temperatura ambiente. 700 μ l foram transferidos para um novo tubo, e destes, 40 μ l foram misturados com 620 μ l de Tampão G. A mistura com Tampão G foi incubada a 65 °C durante a noite. A cada amostra adicionou-se 1 volume de fenol/clorofórmio, agitou-se à temperatura ambiente durante 5 minutos, e centrifugou-se a 4 °C e 16.100 g durante outros 5 minutos. Retirou-se 600 μ l do sobrenadante e adicionou-se um volume de clorofórmio, repetindo de seguida os passos de agitação e centrifugação. Retirou-se 450 μ l do sobrenadante, adicionou-se 2 volumes de etanol absoluto agitando gentilmente, e as amostras foram centrifugadas durante 20 minutos a 2 °C, 16.100g. Descartou-se o sobrenadante, lavou-se o pellet com 200 μ l de etanol 70 % e centrifugou-

se durante 10 minutos a 2 °C, 16.100g. Voltou-se a descartar o sobrenadante, permitindo-o secar por evaporação à temperatura ambiente e ressuspendeu-se o sedimento em 30 µl de água. O DNA ressuspensão foi posteriormente analisado por qPCR, usando o mesmo protocolo que para o estudo de expressão. Correram-se ainda as amostras em gel de agarose 1 %, para determinar a integridade do DNA extraído.

ii. Infiltração/Crosslink

Folhas de plântulas de arroz sujeitas a um tratamento de frio (4°C) *versus* controlo (28°C) foram cortadas em pedaços de aproximadamente 1 a 2 cm, para papel de alumínio arrefecido. Em seguida, cada amostra foi infiltrada em 200 ml de tampão A (0,8% v/v de p-formaldeído, butirato de sódio 10mM, sucrose 0.4M, Tris (pH8) 10mM, β-mercaptoetanol 5mM e PMSF 0.1mM, Anexo I) a 50 mbar. A infiltração foi feita segundo o descrito em Haring *et al.* (2007) salvo algumas modificações. A mistura anterior foi sujeita a vácuo durante 2 minutos, com interrupções sempre que a pressão atingia os 50 mbar pretendidos, e sempre com agitação manual para submergir as folhas de arroz. A solução e as folhas ficaram a agitar durante 1 minuto sem vácuo, até que se adicionou 20 ml de glicina 2M, para interromper a reacção de “crosslink”. Para tal, voltou-se a aplicar vácuo durante 5 minutos, com interrupções a cada 30 segundos. Uma vez completada a fixação as folhas foram lavadas com água corrente, num escoador, secas e congeladas em azoto líquido para posterior maceração.

iii. Isolamento de núcleos

O macerado foi ressuspensão em 40 ml de Tampão B (butirato de sódio 10mM, sucrose 0.4M, Tris (pH 8) 10mM, β-mercaptoetanol 5mM, PMSF 0.1mM, Inibidor de proteases 1x (Roche), Anexo I) num falcon de 50 ml, e incubado com agitação a 4 °C, durante 15 minutos. A suspensão foi filtrada com quatro camadas de “miracloth” para um novo tubo de 50 ml, e de seguida centrifugado a 4 °C, 2880g durante 20 minutos. Descartando o sobrenadante, o precipitado foi então ressuspensão em 1 ml de Tampão C (butirato de sódio 10mM, sucrose 250mM, Tris (pH 8) 10mM, β-mercaptoetanol 5mM, PMSF 0.1mM, MgCl₂ 10mM, Triton X-100 1% (m/V) e Inibidor de proteases 1x (Roche), Anexo I), primeiro adicionando 100 µl e mexendo com um pincel, e depois o restante para diluir. Descartando uma vez mais o sobrenadante, a amostra foi de novo ressuspensão e transferida para um tubo de 1.5 ml para ser centrifugada a 4 °C e 12.000g, durante 10 minutos. Voltou-se a descartar o sobrenadante e a ressuspender o precipitado, desta vez em Tampão D (butirato de sódio 10mM, sucrose 1.64M, Tris (pH8) 10mM, β-mercaptoetanol 5mM, PMSF 0.1mM, MgCl₂ 2mM, Triton X-100 0.15% (m/V) e Inibidor de proteases 1x (Roche), Anexo I). A suspensão foi então aplicada sobre 1.5 ml de Tampão D de forma a criar duas camadas, num tubo de 2 ml, e centrifugada durante 1 hora, a 4 °C e 16.000g. O precipitado obtido (cromatina) foi então ressuspensão em 300 µl de Tampão E (Tris (pH 8)

25mM, EDTA (pH 8) 5mM, SDS 0.5% (m/V), PMSF 0.1mM e Inibidor de proteases 1x (Roche), Anexo I). Neste último passo recolheu-se 30 µl de solução para usar como controlo na determinação da eficiência de sonicação.

iv. Sonicação da cromatina

A cromatina foi sonicada, com um Bioruptor (Diagenode) a 4 °C. As amostras foram submetidas a 13 ciclos, de 30 segundos com ultrassons de intensidade alta seguidos de 30 segundos em repouso para cada ciclo. A amostra sonicada foi de seguida centrifugada a 4 °C, 16.000 g, durante 5 minutos, de forma a precipitar resíduos celulares. O sobrenadante, contendo a cromatina sonicada, foi transferido para um novo tubo de 1.5 ml, de onde se retiraram 20 µl para determinar a eficiência de sonicação (com a amostra guardada no ponto anterior). As duas amostras, sonicada e não-sonicada (necessárias para determinar a eficiência de sonicação) foram então submetidas a um “*decrosslink*” a 65 °C, durante a noite, em 100 µl de Tampão G (Tris (pH 6.8) 62.5mM, NaCl 0.2M, SDS 2% (m/V) e DTT 10mM, Anexo I). Purificou-se o DNA das duas amostras mencionadas com um “*kit*” de purificação de DNA (Roche) e aplicou-se o resultante num gel de agarose 1%, em TAE 1x, para confirmar a presença, e massa média, da banda de DNA sonicado. O tamanho expectável dos fragmentos é de aproximadamente 300 pares de bases, para que o passo de imunoprecipitação seja eficiente, e para que os fragmentos sejam adequados à posterior amplificação com qPCR e respectiva quantificação de marcas por região [Haring *et al.*, 2007].

v. Imunoprecipitação da cromatina e “*decrosslink*”

Para uma pré-purificação da cromatina, utilizou-se 200 µl da amostra obtida aquando do isolamento de núcleos a que se misturou 1.8 ml de Tampão F (Tris (pH 8) 5mM, EDTA (pH 8) 1mM, NaCl 150mM e Triton X-100 0.1% (m/V), Anexo I) e 30 µl de Protein A-Agarose (Santa Cruz Biotechnology). Incubou-se a solução com agitação a 4 °C, durante 3 a 4 h, e centrifugou-se a 500 g, 4 °C, durante 5 minutos, para recolher o sobrenadante.

A imunoprecipitação foi feita utilizando 400 µl de amostra pré-purificada, com 2 µl de anticorpo e 30 µl de Protein A-Agarose (Santa Cruz Biotechnology) – amostra com imunoprecipitação da marca de interesse (AB). Foram utilizados os anticorpos anti-H3K9ac e anti-H4K5ac (Millipore). Como controlo negativo usou-se uma amostra igual à anterior, mas sem anticorpo (NoAB); e como linha base (*input*) utilizaram-se outros 40 µl de amostra pré-purificada (sem beads de agarose ou proteína A). As amostras de imunoprecipitação (imunoprecipitada e negativo, AB e NoAB respetivamente) foram incubadas com agitação a 4 °C, durante a noite, e depois centrifugadas a 500 g durante 5 minutos, e ainda incubadas em gelo por mais 5 minutos. O sobrenadante (cromatina pré-purificada usada) foi recolhido e guardado para eventual utilização, e o precipitado (beads de agarose-proteína A com fragmentos de cromatina adsorvida)

foi lavado com os seguintes tampões de lavagem: Low salt (NaCl 150mM, SDS 0.1% (m/v), Triton X-100 1% (m/V), EDTA 2mM e Tris (pH 8) 20mM), High salt (NaCl 0.5M, SDS 0.1% (m/V), Triton X-100 1% (m/V), EDTA 2mM e Tris (pH 8) 20 mM), LiCl (LiCl 250mM, Igepal 1% (m/V), EDTA 1mM, Tris (pH 8) 20mM) e TE (Tris (pH 8) 10mM, EDTA 1mM) (este último foi usado duas vezes – ver constituições dos tampões de lavagem (Anexo I). Cada tampão foi aplicado, pela ordem anteriormente apresentada, repetindo para cada um o seguinte método: aplicou-se 900 µl de tampão, agitou-se a suspensão a 4 °C durante 10 minutos, centrifugou-se a 500 g e 4 °C, durante 5 minutos, e descartou-se o sobrenadante. No fim do processo de lavagem deixou-se o precipitado secar, de forma a não restar solução de TE na amostra. A seguir ao processo de lavagem, adicionou-se 200 µl de tampão G (Anexo I) por cada amostra, misturou-se utilizando um vórtex e incubou-se a cromatina adsorvida em *beads* de agarose a 65 °C durante a noite. Este passo foi também aplicado à amostra de *input* anteriormente mencionada. Uma vez feito o *decrosslink* (incubação a 65 °C) recolheu-se o sobrenadante, evitando o precipitado (transparente e viscoso) e purificou-se o DNA com um *Kit* de purificação de DNA (Roche).

vi. Quantificação de marcas por qPCR

Para a quantificação de marcas histónicas, através da amplificação dos fragmentos fixados a estas histonas, utilizaram-se os *primers* indicados na Tabela 1. As condições de corrida foram as mesmas que as usadas na análise das amostras de qPCR do estudo de expressão, com a variante de que foi usado um volume de 7 µl de amostra e 1 µl de água milli-Q (Roche) por poço.

Tabela 1 - Primers usados para qPCR de ChIP, para a região do promotor de *OsDREB1B*.

Região do promotor (relativo ao ATG)	Denominação	Sequência
-151 a -3 pb	Fw 1	CTGTTCCCTTTCCATTTC
	Rv 1	TGACTCTCTCTGGTTCCTTCG
-280 a -121 pb	Fw 2	CCCAACAGAAACCACAGAAAA
	Rv 2	GCGGGGATAGCTGGAAAT
-394 a -227 pb	Fw 3	CCCCATGAACCCCATCTA
	Rv 3	TGCTGCTACTCCAGCTTGC
-519 a -355 pb	Fw 4	TGACTAAACTGAGAGTGTGAAATGA
	Rv 4	AACTTGACGAGGGAAAACATTC

IV - Resultados

1. O gene *OsDREB1B* é induzido pelo frio em diferentes genótipos

A quantificação de transcritos do gene *OsDREB1B* foi analisada em folhas de plântulas de arroz (*Oryza sativa L. japonica*) de diferentes genótipos nomeadamente, Dongjin e Nipponbare com 14 dias de crescimento e após a imposição de um tratamento de frio (4 °C) durante 4 horas sendo a intensidade luminosa incidente durante o *stress* de frio de 200 μmol de fotões. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Para cada genótipo calcularam-se as taxas de sobrevivência através da razão entre plântulas viáveis e sementes utilizadas sendo que em Nipponbare a taxa foi de 70% e em Dongjin 92% indicando uma maior suscetibilidade de Nipponbare ao *stress* de frio. Foram feitos ensaios de crescimentos de plântulas em diferentes condições luminosas, 500 μmol de fotões. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (ensaio A) ou 200 μmol de fotões. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (ensaio B).

A análise do número de transcritos, obtidos por qPCR, mostra que o gene *OsDREB1B* é claramente induzido pelo *stress* de frio em ambos os genótipos e ensaios realizados (Figura 6). Em condições de *stress* de frio, Nipponbare apresenta um maior número de transcritos e sobre-expressão do gene *OsDREB1B* que em Dongjin (Figura 6). Considerando os ensaios (A) e (B) realizados com diferentes intensidades luminosas, Nipponbare apresenta uma redução do número de transcritos de *OsDREB1B*, tanto para condições controlo como de *stress*, registando-se reduções na ordem dos 30% nos dois casos (Figura 6). Por outro lado, em Dongjin, registou-se uma redução no número de transcritos de *OsDREB1B* de 20% em condições de *stress*, mas um aumento para aproximadamente 370% em condições controlo (Figura 6). Em condições de *stress*, Nipponbare apresenta uma diferença entre razões de amplificação de 1,63 e 16,4 vezes maior que em Dongjin (Figura 7, ensaios A e B, respetivamente).

Em Nipponbare, o aumento de sobre-expressão de *OsDREB1B* em condições de intensidade luminosa constante (ensaio B) foi de aproximadamente 219% relativamente ao observado no ensaio (A) em que o crescimento das plântulas foi efetuado com uma intensidade luminosa superior (Figura 7). No caso de Dongjin, calculou-se uma diminuição de sobre-expressão de *OsDREB1B* no ensaio (B), registando-se apenas 21,8% da sobre-expressão observada no ensaio (A) realizado com uma maior intensidade luminosa na fase de crescimento (Figura 7).

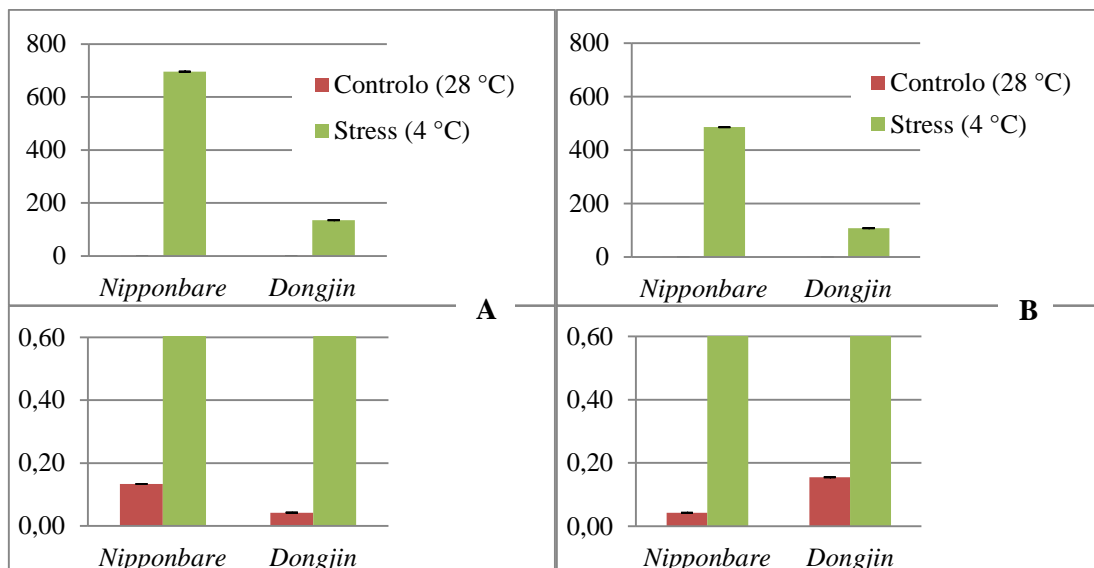


Figura 6 – Estudo de expressão do gene *OsDREB1B*. A expressão relativa do *OsDREB1B* foi calculada dividindo o número de transcritos de *OsDREB1B* pelos do gene normalizador *OsUBC2* (*housekeeping gene*). Os gráficos em baixo são uma ampliação da escala de transcritos, de forma a clarificar as variações em condições controlo. Ensaios feitos com intensidades luminosas: (A – esquerda) de crescimento a 500 μ mol de fotões.m⁻².s⁻¹ e de stress a 200 μ mol de fotões.m⁻².s⁻¹; (B – direita) de crescimento e stress a 200 μ mol de fotões.m⁻².s⁻¹.

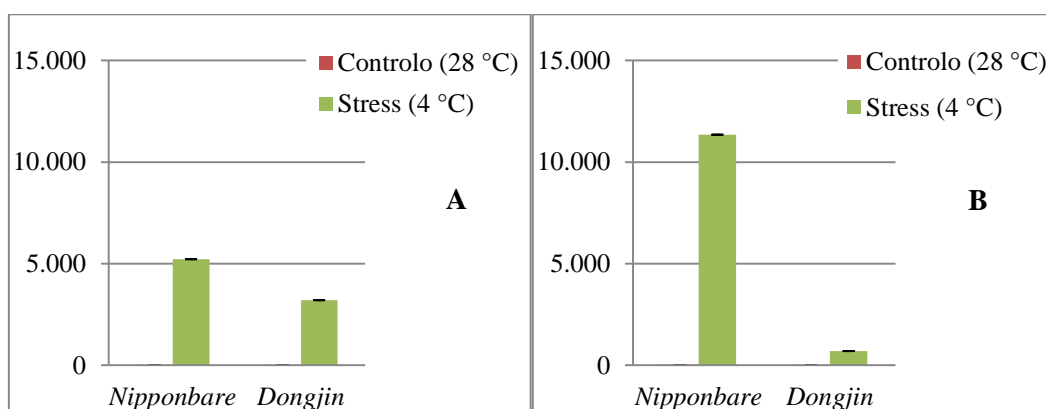


Figura 7 – Estudo de sobre-expressão do gene *OsDREB1B* em condições controlo *versus* stress. As razões de amplificação (RA) da expressão de *OsDREB1B* (relativas a *OsUBC2*) foram obtidas pela normalização com as respectivas amostras controlo [RA (amostra X) = $\left(\frac{DREB1B}{UBC2}(amostra X)\right) / \left(\frac{DREB1B}{UBC2}(controlo wt)\right)$] – RA de controlos é igual a 1. Ensaios feitos com intensidades luminosas: (A) de crescimento a 500 μ mol de fotões.m⁻².s⁻¹ e de stress a 200 μ mol de fotões.m⁻².s⁻¹; (B) de crescimento e stress a 200 μ mol de fotões.m⁻².s⁻¹.

2. A indução do gene *OsDREB1B* pelo frio é potenciada pela presença de epimutações

Neste trabalho utilizaram-se plantas de arroz com mutações específicas para uma acetiltransferase de histonas (HAC704) e uma metiltransferase de DNA (DMT706). Estas linhas mutantes são *knockouts* de OsDRM2 ([LOC_Os03g02010] que é uma *de novo* DNA metiltransferase e de OsHAC704 ([LOC_Os06g49130] que é uma acetiltransferase de histonas. A variedade Dongjin representa o “wild-type”, a variedade a partir do qual foram obtidas as linhas mutantes de arroz. A taxa de sobrevivência calculada através da razão entre plântulas viáveis e sementes utilizadas foi de 92% em Dongjin, 50% em HAC704 e 19% em DMT706. A presença de epimutações traduziu-se em taxas de sobrevivência bastante menores relativamente ao *wild-type*, por exemplo, no mutante HAC704 (*knockout* de acetiltransferase histónica) a taxa de sobrevivência foi 54% da apresentada por Dongjin, e no mutante DMT706 (*knockout* de *de novo* metiltransferase de DNA) a taxa foi ainda mais reduzida sendo apenas 20% da apresentada em Dongjin (*wt*).

A quantificação de transcritos do gene *OsDREB1B* foi analisada em folhas de plântulas com 14 dias, após a imposição de um *stress* de frio (4°C) durante 4 horas. Em condições de *stress* de frio, os mutantes DMT706 e HAC704 apresentaram sempre maior expressão do gene *OsDREB1B* que Dongjin (*wt*), sendo que a indução da expressão foi maior em DMT706 que em HAC704, nomeadamente, o gene *OsDREB1B* é cerca de 1.87 e 1.52 vezes mais expresso no mutante DMT706 do que no mutante HAC704, e 3.33 e 2.95 vezes mais expresso em DMT706, comparando com Dongjin nos ensaios (A) e (B) respetivamente (Figura 9).

Em condições de *stress* e de luminosidade constante (ensaio B) registou-se em todas as linhas uma redução de expressão de *OsDREB1B* para aproximadamente 80, 65 e 71% do registado no ensaio (A) com plântulas crescidas sob uma intensidade luminosa superior. Por outro lado, com uma menor intensidade luminosa durante o crescimento (ensaio B) registou-se uma maior expressão de *OsDREB1B* em condições controlo, apresentando aumentos de 368, 310 e 1340% em Dongjin, HAC704 e DMT706 respetivamente, em relação aos resultados do ensaio (A). De acordo com os dados de expressão de *OsDREB1B*, a sobre-expressão deste gene em condições de *stress* demonstra uma redução acentuada no ensaio (B), comparando com o ensaio (A) de maior intensidade luminosa durante o crescimento (Figura 10). A sobre-expressão de *OsDREB1B* foi reduzida no ensaio (B) para aproximadamente 22, 18 e 19% do que foi registado em (A), para Dongjin, HAC704 e DMT706 respetivamente (Figura 10).

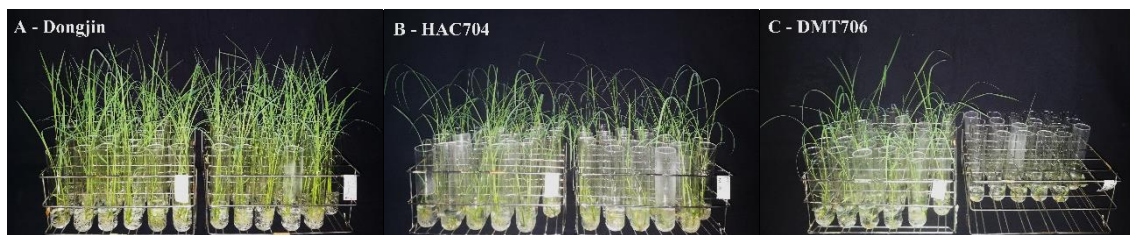


Figura 8 - Representação populacional de *Oryza sativa* L. wt (A) e plantas com mutações em moduladores epigenéticos (B e C) em condições controle, após 13 dias de desenvolvimento. Dongjin (A), HAC704 (B) e DMT706 (C).

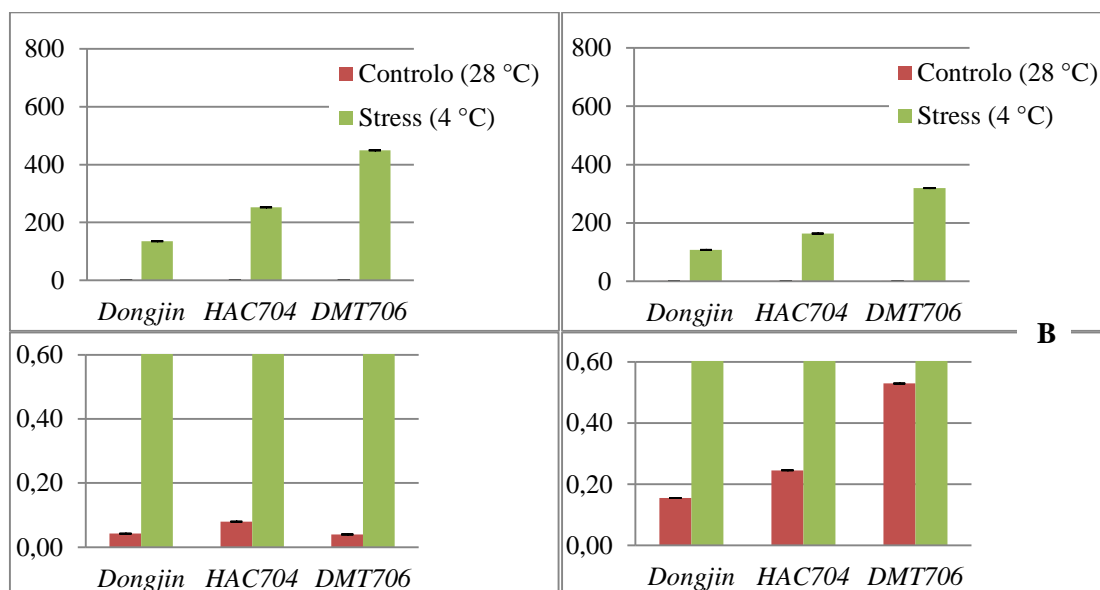


Figura 9 - Estudo de expressão do gene *OsDREB1B*. A expressão relativa do *OsDREB1B* foi calculada dividindo o número de transcritos de *OsDREB1B* pelos do gene normalizador *OsUBC2* (*housekeeping gene*). Os gráficos em baixo são uma ampliação da escala de transcritos, de forma a clarificar as variações em condições controle. Ensaios feitos com intensidades luminosas: (A – esquerda) de crescimento a 500 μmol de fotões. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e de stress a 200 μmol de fotões. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$; (B – direita) de crescimento e stress a 200 μmol de fotões. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

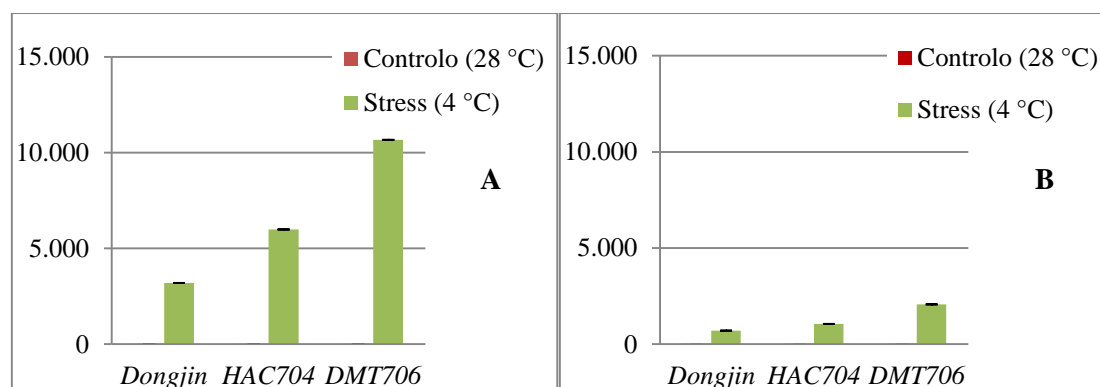


Figura 10 – Estudo de sobre-expressão do gene *OsDREB1B* em condições de controle *versus* stress. As razões de amplificação (RA) da expressão de *OsDREB1B* (relativa a *OsUBC2*) foram obtidas pela normalização com a amostra controle do wt [RA (amostra X) = $\left(\frac{DREB1B}{UBC2}(amostra X)\right) / \left(\frac{DREB1B}{UBC2}(controle wt)\right)$]. Ensaios feitos com intensidades luminosas: (A) de crescimento a 500 μmol de fotões. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e de stress a 200 μmol de fotões. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$; (B) de crescimento e de stress a 200 μmol de fotões. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

3. A expressão do gene *OsDREB1B* é influenciada pelo tratamento com drogas remodeladoras da cromatina

Neste estudo foram aplicadas drogas remodeladoras da cromatina, nomeadamente a tricostatina A, uma droga inibidora de acetilases histónicas [Yoshida *et al.*, 1990; Yoshida *et al.*, 1995] que induz hiperacetilação histónica global [Tóth *et al.*, 2004], e a 5-azacitidina, uma droga capaz de induzir uma hipometilação global de DNA e um rearranjo da cromatina [Santos *et al.*, 2011]. Adicionalmente, a 5-AC também interfere com a paisagem histónica causando a perda de histonas metiladas [Komashko *et al.*, 2010].

Neste estudo, mostramos que ambas as drogas (TSA e 5-AC) podem influenciar a expressão do gene *OsDREB1B*, tanto em condições controlo como após imposição de um *stress* de frio. A droga TSA demonstrou favorecer a expressão de *OsDREB1B* entre 2 a 5 vezes em condições controlo (Figura 11). Em condições de *stress*, os efeitos da aplicação de TSA não são lineares dado que em Nipponbare e DMT706 se registou uma redução de expressão do gene e em Dongjin um aumento. A aplicação de 5-AC também afetou a expressão do gene, nomeadamente, em temperatura controlo registou-se um aumento de expressão em Nipponbare no entanto em HAC704 e DMT706, verificou-se uma redução da expressão do gene (Figura 11). Em condições de *stress* de frio, o tratamento com 5-AC está associado a uma redução de expressão em Nipponbare e HAC704, e a um aumento de expressão em Dongjin e DMT706 (Figura 11). Comparando as sobre-expressões de *OsDREB1B* em condições de *stress* de frio *versus* controlo calculadas para o meio sem drogas, verifica-se que a razão de amplificação de Nipponbare se apresenta numa escala bastante superior à das razões das restantes linhas muito embora não exista o resultado de sobre-expressão para a linha de Dongjin no meio sem drogas (Figura 12). Adicionalmente, a sobre-expressão de *OsDREB1B* em Nipponbare apresenta-se em todos os ensaios (sem drogas, com TSA ou com 5-AC) superior às registadas para as restantes linhas, evidenciando uma maior diferença de expressão deste gene entre condições controlo e *stress de frio* (Figura 12). Por outro lado, mediante o tratamento com 5-AC observa-se entre Nipponbare e as restantes linhas uma menor diferença entre as sobre-expressões, apresentadas na Figura 12, quando comparadas com os resultados obtidos na ausência de drogas. Ocorreu portanto, em meio com 5-AC, uma atenuação da sobre-expressão de Nipponbare (relativa às das outras linhas) quando comparada com a obtida na ausência de drogas (Figura 12). Na presença de TSA, apesar de se terem registado valores elevados de expressão de *OsDREB1B* em condições controlo (Figura 11), todas as linhas apresentaram valores semelhantes de amplificação deste gene em *stress* (tal como se pode ver na Figura 12, com as razões de amplificação calculadas a partir dos valores de expressão de *stress* de frio *versus* controlo, presentes na Figura 11 para o meio com TSA). Resumidamente, o tratamento com TSA causou uma sobre-expressão de *OsDREB1B* menor que em meio sem droga, e com sobre-expressões relativamente semelhantes entre as diferentes linhas

de arroz (Figura 12). Por outro lado a 5-AC causou uma redução de sobre-expressão do gene em Nipponbare, e um aumento em HAC704 e DMT706 sem alterar a relação de sobre-expressão registada anteriormente entre mutantes e *wt* (sobre-expressões decrescentes para Nipponbare, DMT706, HAC704 e Dongjin tal como se pode ver nas Figuras 7 e 10 (B)).

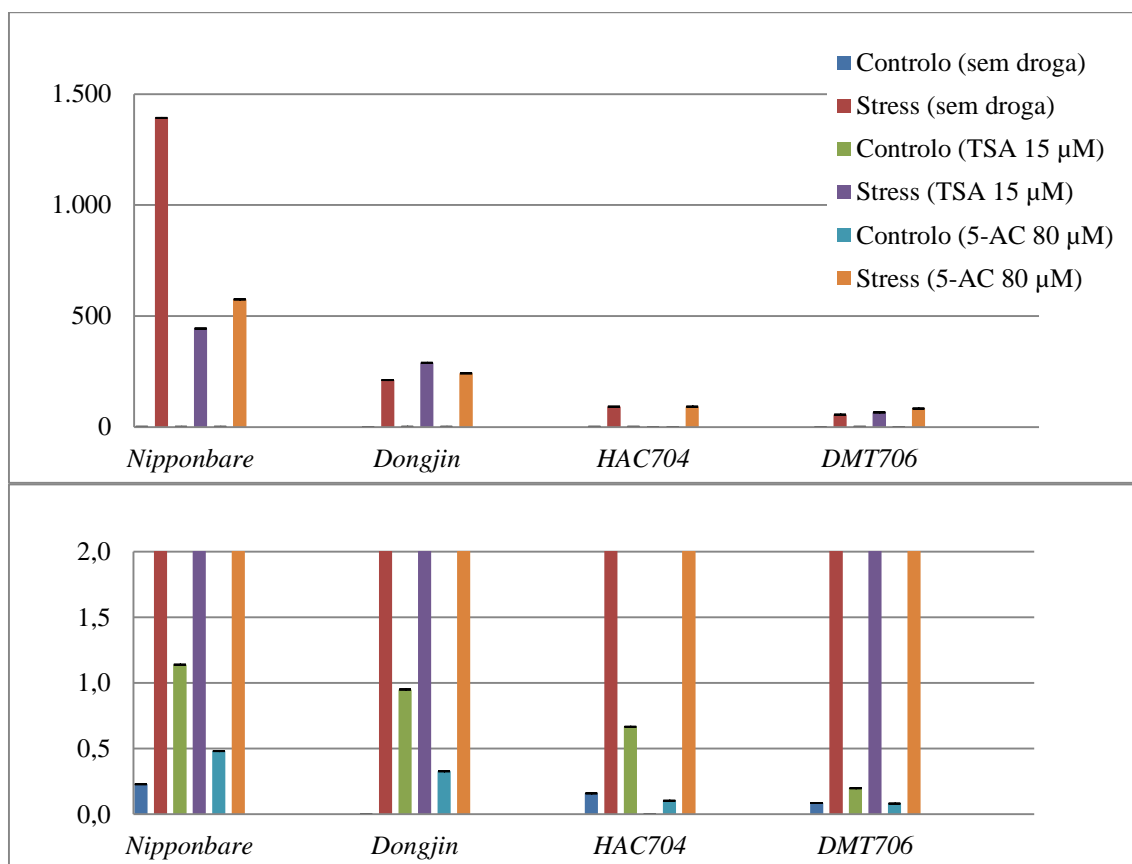


Figura 11 - Estudo de expressão do gene *OsDREB1B* em diferentes genótipos e em mutantes após o tratamento com drogas remodeladoras da cromatina. O número de transcritos normalizados de *OsDREB1B* foi calculado dividindo o número de transcritos de *OsDREB1B* pelos de *OsUBC2* (*housekeeper*). O gráfico em baixo é uma ampliação da escala de transcritos, de forma a clarificar as variações em condições controlo. Ensaio de frio (4h a 4°C) com meio Yoshida sem ou com drogas (TSA 15 μ M, ou 5-AC 80 μ M) sob intensidade luminosa constante (200 μ mol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). *Não estão representados resultados de controlo (sem droga) para Dongjin, nem de *stress* (TSA) para HAC704.

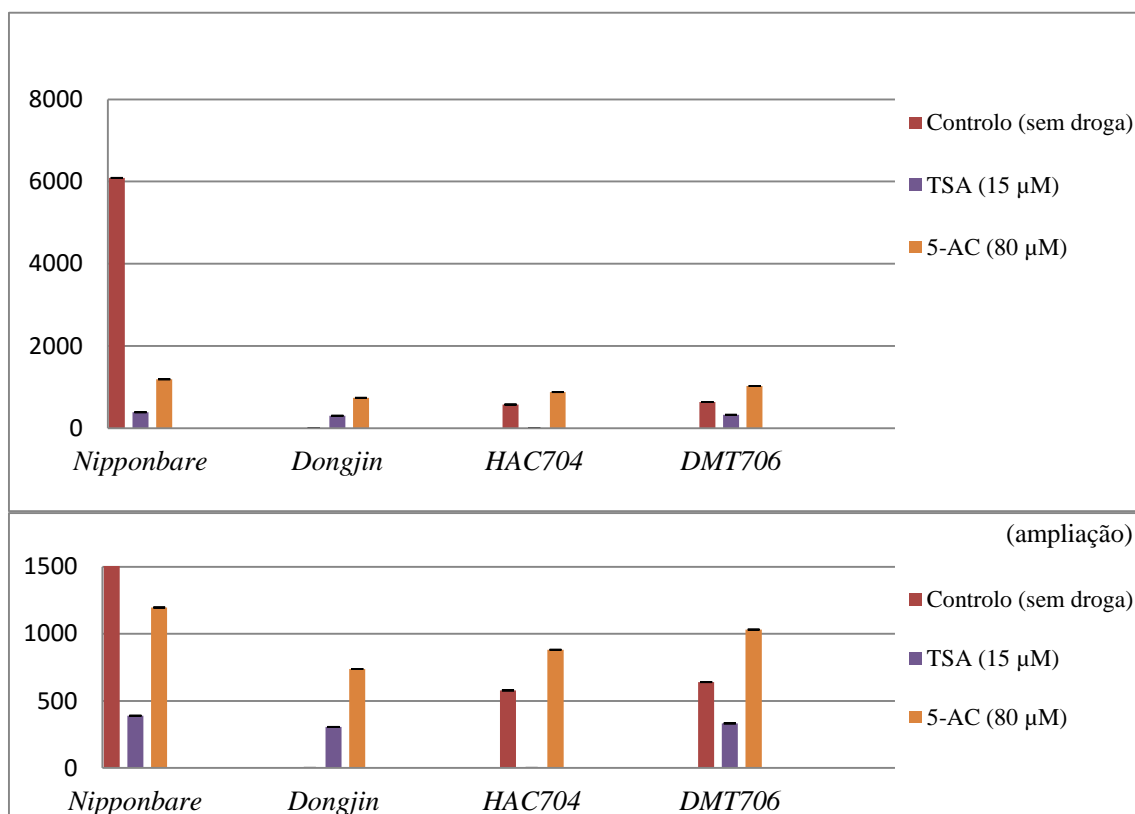


Figura 12 - Estudo de sobre-expressão do gene *OsDREB1B* em diferentes genótipos e em mutantes após o tratamento com drogas remodeladoras da cromatina. Os dados referem-se a amostras de *stress* de frio (4h a 4 °C), normalizadas com os controlos das respectivas linhas e meios. O gráfico em baixo é uma ampliação da escala de sobre-expressão, de forma a clarificar as variações entre ensaios. *Não estão representadas a amostra de *stress* em meio sem droga de Dongjin, nem a de HAC704 em meio com tricostatina A (TSA).

4. Análise de modificações das histonas no promotor do gene *OsDREB1B* em resposta ao frio através de ChIP-qPCR.

O primeiro passo consistiu na otimização dos processos de fixação da cromatina. Foram feitos dois ensaios FAIRE (*formaldehyde-assisted isolation of regulatory elements*), com o intuito de definir qual a melhor concentração de p-formaldeído a usar no passo de infiltração de ChIP na sequência do trabalho previamente desenvolvido no laboratório (Figueiredo D, resultados não publicados). Com estes ensaios, pretendeu-se também aferir as condições que permitem obter uma maior recuperação de DNA de amostras obtidas em condições de *stress* de frio *versus* amostras controlo. Nas amostras infiltradas com 0.8%, ou com 1%, de p-formaldeído, praticamente não se obteve recuperação de DNA de cromatina fixada (“*crosslink*”) comparativamente à recuperação de DNA na ausência de p-formaldeído pelo que o processo de fixação terá sido eficaz (Figura 13). Tal como expectável, verificou-se uma grande recuperação de DNA após “*decrosslink*”, donde se deduz que ambas as situações, 0.8% e 1% de p-formaldeído, garantem a reversibilidade de fixação da cromatina. Em termos comparativos, as amostras infiltradas com 0.8% de p-formaldeído permitiram uma maior recuperação de DNA após “*decrosslink*” sendo aproximadamente o dobro da observada quando as amostras foram infiltradas com 1%, pelo que se determinou a concentração de 0.8 % como a ideal para assegurar a fixação e posterior recuperação da cromatina.

O processo de sonicação de amostras de cromatina também foi testado procurando-se obter fragmentos de DNA de aproximadamente 300 pares de bases, referido como o tamanho ideal para um processo de imunoprecipitação eficiente e posterior amplificação com qPCR e quantificação de marcas por região [Haring *et al.*, 2007]. Utilizando um Bioruptor (Diagenode), determinou-se que as melhores condições para sonicação seriam de 13 ciclos de 30 segundos com sonicação, mais 30 em repouso, com sonicação de baixa intensidade. Os fragmentos obtidos após a sonicação têm um tamanho médio de ~300 pb (Figura 15).

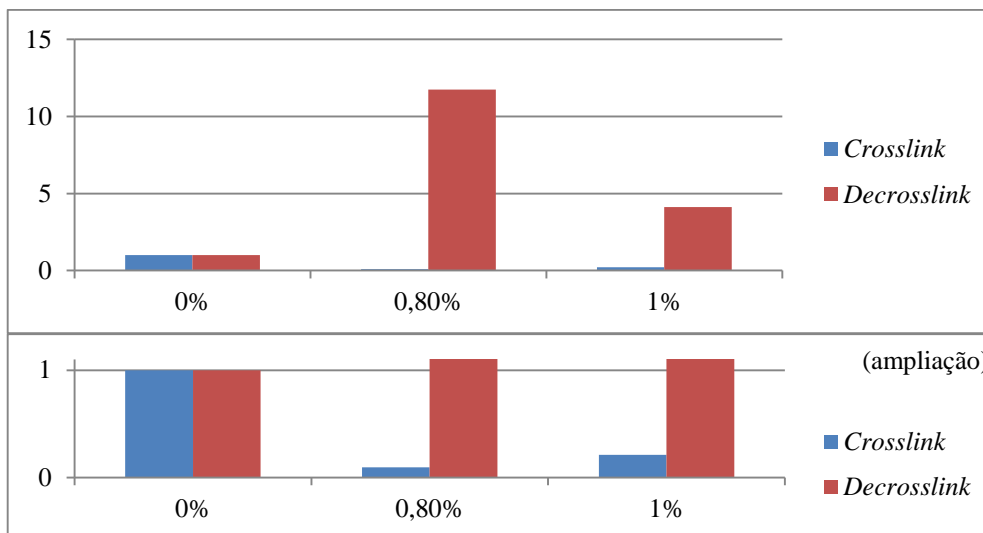


Figura 13 – Quantidade relativa de fragmentos amplificados por qPCR, obtidos de amostras cuja cromatina foi fixada com 0%, 0.8% e 1% de p-formaldeído, durante um minuto de infiltração. Para cada condição purificou-se DNA fixado, cuja fixação foi, ou não, revertida – *decrosslink* e *crosslink* respetivamente. O gráfico em baixo é uma ampliação para clarificar relações entre amostras *crosslink*.

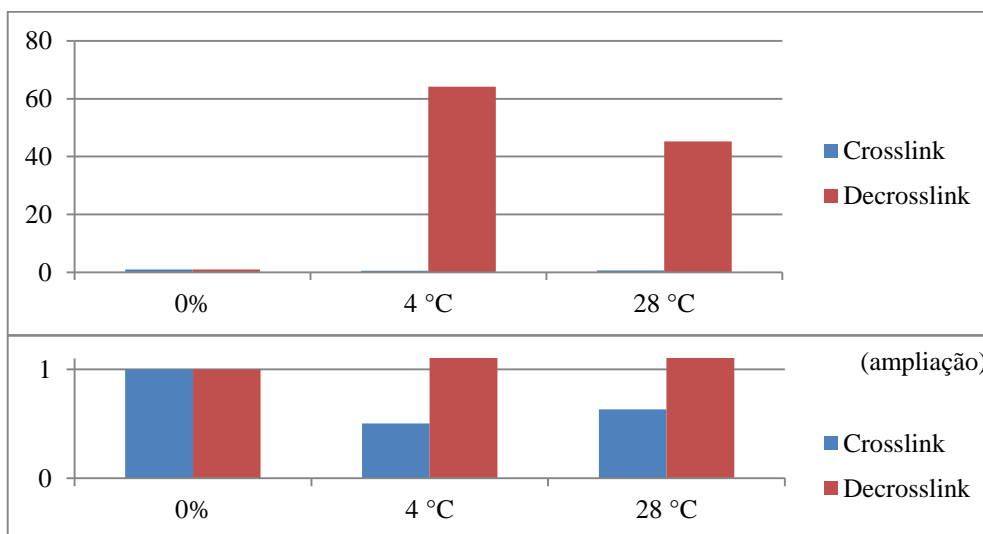


Figura 14 – Quantidade relativa de fragmentos amplificados por qPCR, obtidos de amostras cuja cromatina foi fixada com 0% (H₂O) e 0.8% (4 e 28 °C) de p-formaldeído, durante um minuto de infiltração. A cromatina das duas amostras comparadas foi obtida em condição de *stress* a estudar e em controlo. Para cada condição purificou-se DNA, cuja fixação foi, ou não, revertida – *decrosslink* e *crosslink* respetivamente. O gráfico em baixo é uma ampliação para clarificar relações entre amostras *crosslink*.

Eficácia de sonicacção.

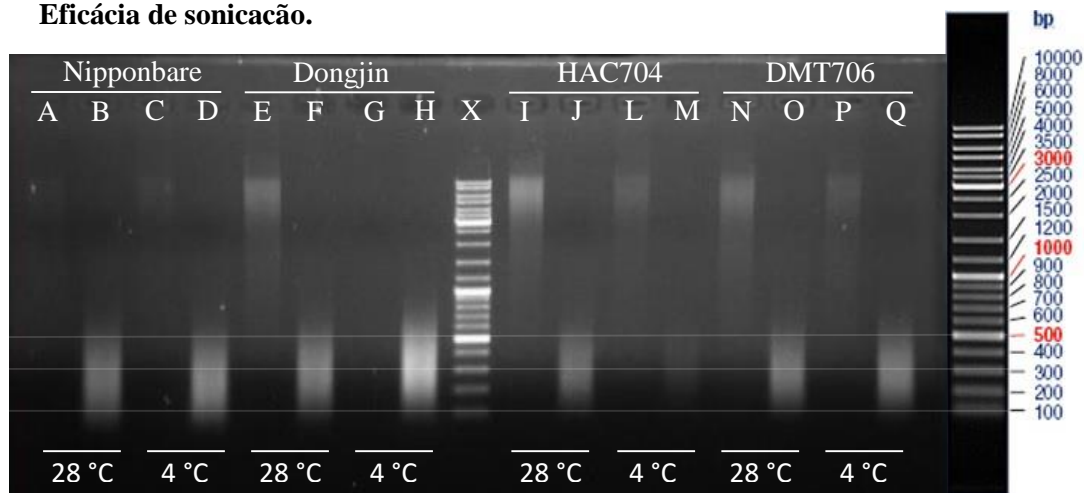


Figura 15 – Sonicação da cromatina. Cromatina sonicada (B, D, F, H, J, M, O, Q) e não-sonicada (A, C, E, G, I, L, N, P) em gel de electroforese. Foi usado ‘O’ gene ruler DNA ladder’ como meio de determinação de tamanhos moleculares (X).

i. Os padrões histônicos no promotor de *OsDREB1B* são influenciados pelo genótipo.

A incidência das marcas histônicas foi calculada como *%input* (ou percentagem de DNA-alvo que é precipitado com os anti-corpos). Para esse efeito foi feita a quantificação por qPCR, do fragmento de DNA presente nas amostras *input* (DNA-alvo total, presente na amostra), AB (DNA-alvo precipitado com anti-corpos) e NoAB (DNA-alvo precipitado sem anti-corpos) obtidas para cada imunoprecipitação (a origem destas amostras está descrita na secção de Métodos). Após as quantificações pôde-se calcular a *%input* com a seguinte fórmula:

$$\%input = \frac{AB - NoAB}{input}.$$

A imunoprecipitação da cromatina foi feita com os anticorpos para H3K9ac e H4K5ac, marcas essencialmente associadas a ativação transcricional. A análise de imunoprecipitação da cromatina foi feita com 4 pares de *primers* para regiões específicas do promotor de *OsDREB1B* (Figura 16). A quantificação de marcas histônicas é representada pelos fragmentos amplificados a partir dessas regiões (F/R1, 2, 3 e 4).

A presença da modificação histônica H3K9ac foi avaliada em Nipponbare e Dongjin, em condições controlo (28 °C) *versus stress* de frio (4 °C). No fragmento mais afastado em relação ao ATG (F/R4 na região de -519 a -355 pares de bases) a marca H3K9ac é particularmente abundante em Dongjin em condições controlo, mas menos em condições de *stress* de frio (Figura 17). Esta marca encontra-se coincidentemente presente na região mais próxima do ATG de ambas as linhas (fragmento F/R1), tanto em condições controlo, como em *stress* (Figura 18). No fragmento F/R4 de Nipponbare houve uma *%input* bastante reduzida, demonstrando uma possível diferença que a região representa na regulação de *OsDREB1B* entre Nipponbare e Dongjin. Relativamente, à marca H4K5ac, a *%input* foi bastante menor que a obtida com H3K9ac, exceto na região [-280; -121] pb de Nipponbare em condições de *stress* (Figura 18).

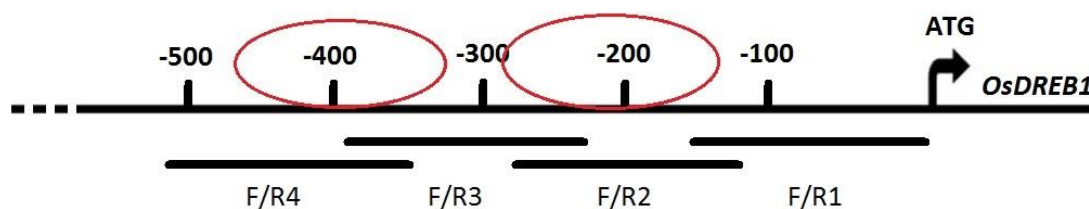


Figura 16 – Representação das regiões do promotor de *OsDREB1B* analisadas. Os fragmentos amplificados estão representados por FR1 [-151; -3]; FR2 [-280; -121]; FR3 [-394; -227]; FR4 [-519; -355]. Os círculos vermelhos indicam os sítios de ligação de fatores de transcrição (zinc-fingers do tipo C2H2) identificados em Nipponbare [Figueiredo *et al.*, 2012].

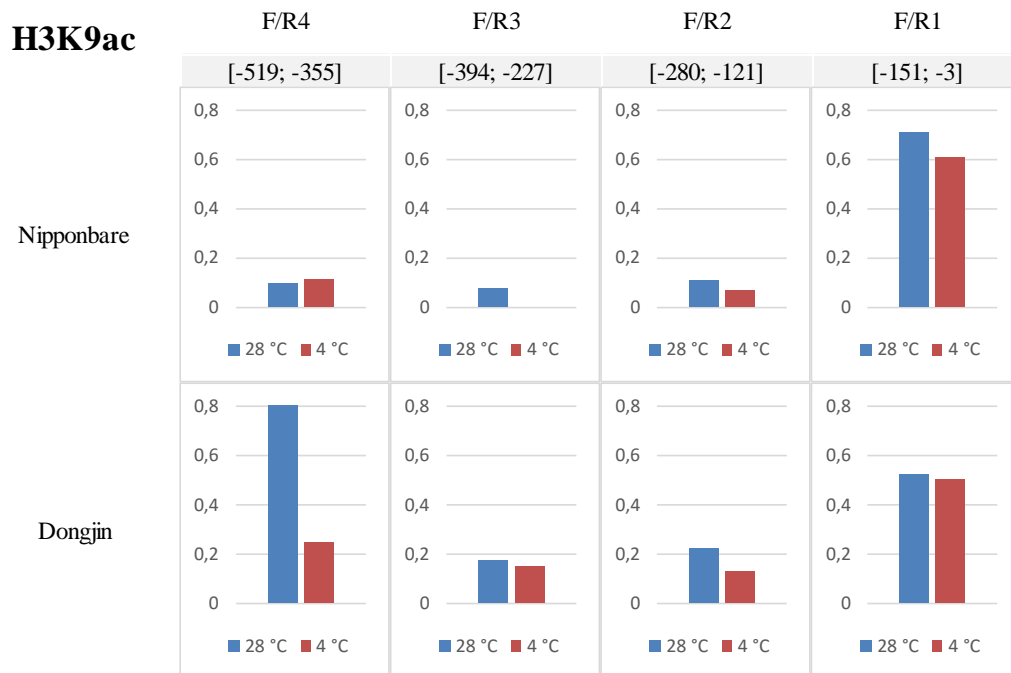


Figura 17 - Percentagem de cromatina imunoprecipitada com o anticorpo contra a H3K9ac para determinadas regiões do promotor do gene *OsDREB1B*, de Nipponbare e Dongjin sob condições de controlo (28 °C) e *stress* (4 °C). Não está exposto o valor para o fragmento [-394; -227] pb de Nipponbare sob *stress*.

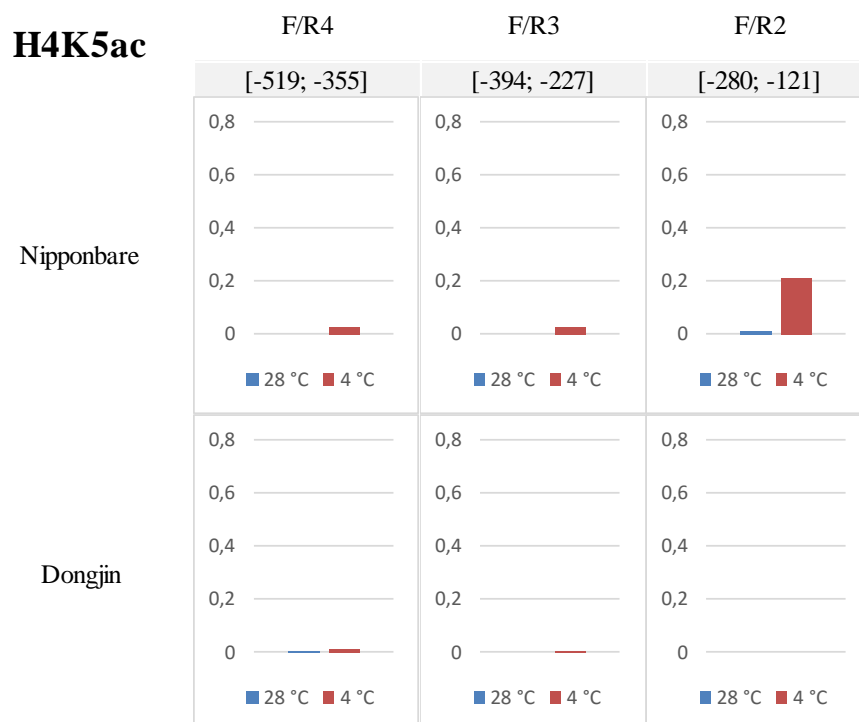


Figura 18 – Percentagem de cromatina imunoprecipitada com anticorpo contra a H3K9ac para determinadas regiões do promotor do gene *OsDREB1B*, de Nipponbare e Dongjin sob condições de controlo (28 °C) e *stress* (4 °C).

ii. Redução das marcas H3K9ac e H4K5ac nos epi-mutantes

A marca H3K9ac (Figura 19), no caso dos mutantes, apresenta-se com nível presencial muito baixo. Em Dongjin esta marca encontra-se presente na região mais próxima do ATG, tanto em condições controlo como em *stress* (Figura 17). Adicionalmente, em Dongjin, no fragmento mais afastado em relação ao ATG (F/R4 na região de -519 a -355 pares de bases) H3K9ac é particularmente abundante em condições controlo, mas menos em condições de *stress* de frio. Os valores de %input de H3K9ac nos mutantes são muito reduzidos comparativamente a Dongjin (wt) (Figura 19) e não apresentam diferenças relevantes entre elas (Figura 17). A marca H4K5ac apresenta pouca ou nenhuma presença nos três fragmentos analisados (F/R2, 3 e 4), em Dongjin, HAC704 ou DMT706, indicando que não se encontrava presente em grande extensão nos tecidos analisados. Não foram observadas alterações na paisagem histónica das marcas H3K9ac ou H4K5ac dos mutantes em condições de *stress* de frio (Figuras 19 e 20). O código histónico de H3K9ac presente em Dongjin não se encontra estabelecido nos mutantes, tanto em condições controlo como em *stress* de frio.

H3K9ac

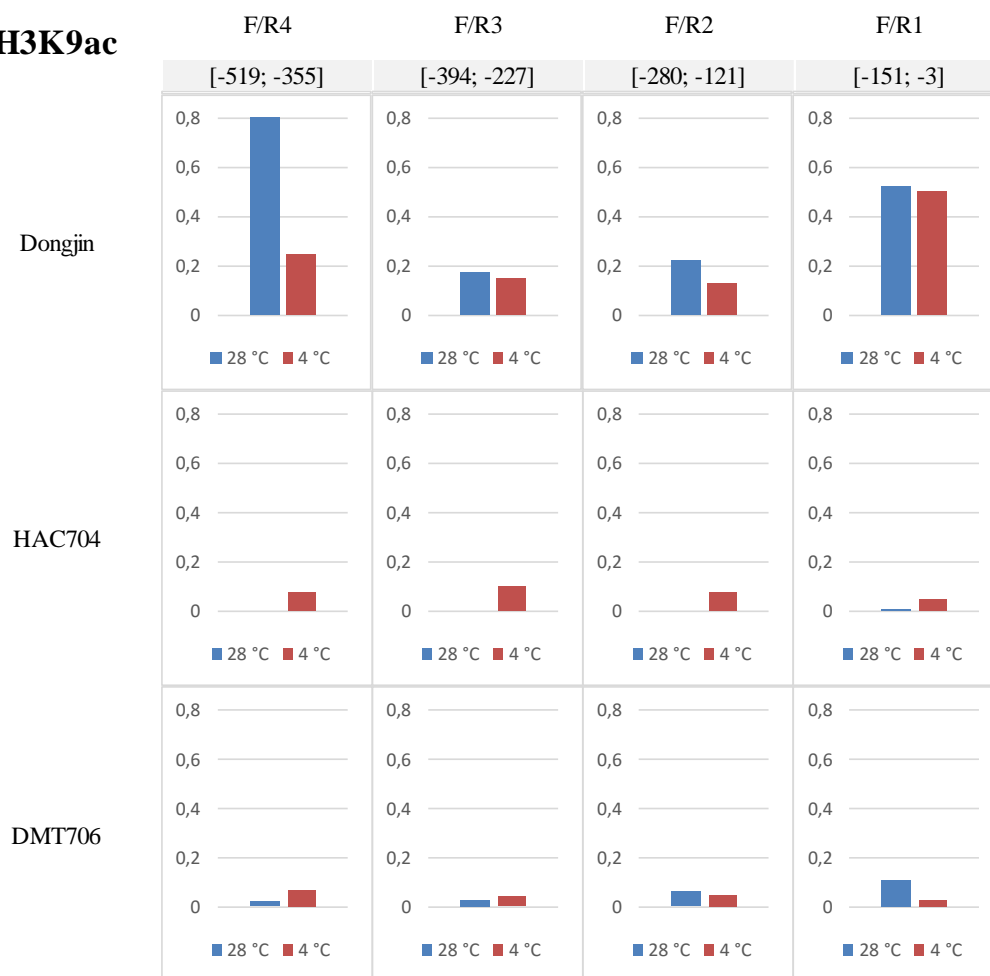


Figura 19 - Percentagem de cromatina imunoprecipitada com anticorpo contra a H3K9ac para determinadas regiões do promotor do gene *OsDREB1B*, de Dongjin, HAC704 e DMT706 sob condições de controle (28 °C) e *stress* (4 °C). Não estão expostos valores para o controle da linha HAC704 pois a amostra não pôde ser utilizada.

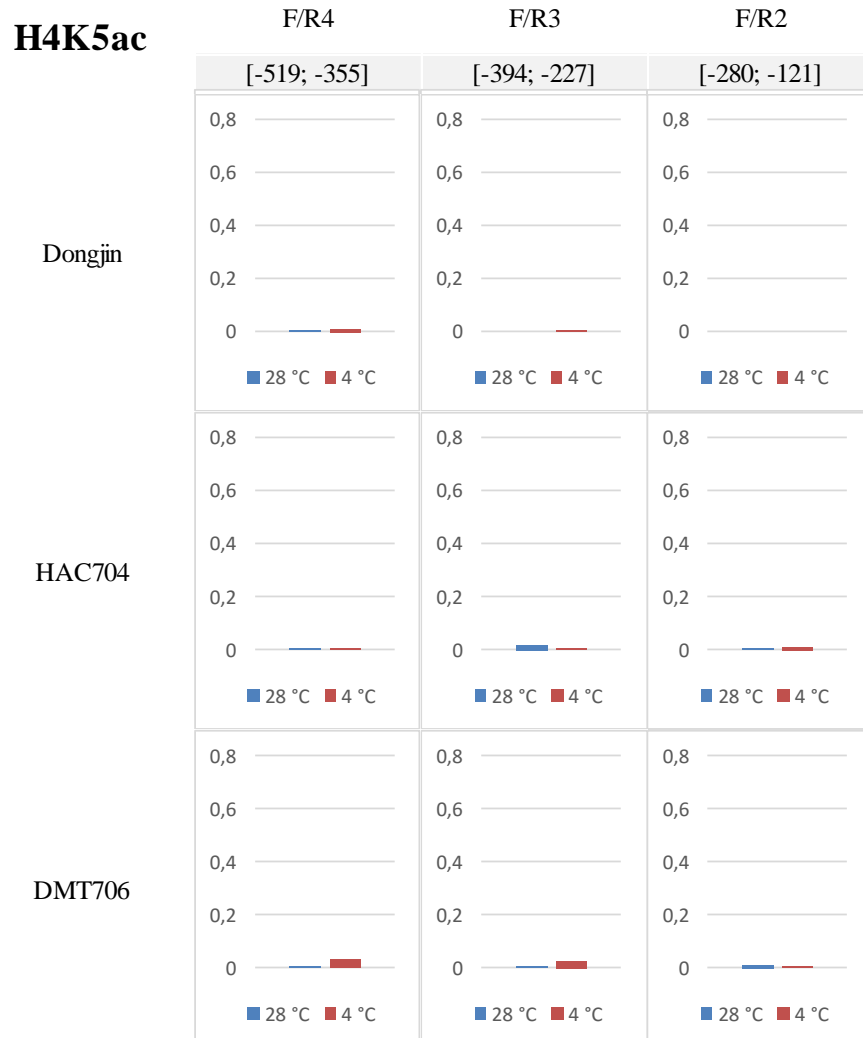


Figura 20 – Percentagem de amostras de cromatina imunoprecipitada com anticorpo contra a H3K9ac para determinadas regiões do promotor do gene *OsDREB1B*, de Dongjin, HAC704 e DMT706 sob condições de controlo (28 °C) e *stress* (4 °C).

V - Discussão

1. A indução da expressão do gene *OsDREB1B* em resposta ao frio é influenciada pelo genótipo e pela intensidade luminosa

A indução da expressão do gene *OsDREB1B* em resposta ao *stress* abiótico de frio tem sido extensivamente referenciada na literatura [Liu *et al.*, 1998; Dubouzet *et al.*, 2003; Figueiredo *et al.*, 2012]. No presente estudo, todas as linhas testadas, Nipponbare, Dongjin, HAC704 e DMT706, apresentaram uma sobre-expressão de *OsDREB1B*, após imposição de um *stress* de frio durante 4 horas, no entanto foi possível detetar diferenças de expressão e sobre-expressão do gene entre Nipponbare e Dongjin sendo que o gene é mais sobre-expresso em Nipponbare que em Dongjin, em resposta ao frio.

A expressão do gene *OsDREB1B* também é sensível à variação de intensidade luminosa uma vez que em Nipponbare a transição entre 500 $\mu\text{mol de fotões.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ durante o crescimento das plantas, para 200 $\mu\text{mol de fotões.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ durante a aplicação do *stress* de frio, levou a uma maior expressão de *OsDREB1B*, em controlo e após o *stress*, em comparação com o ensaio de menor intensidade de luz durante a fase de crescimento. Em contraste, a intensidade de luz constante, durante a fase de crescimento e de aplicação do *stress*, esteve associada a reduções de expressão de *OsDREB1B* em Nipponbare na ordem dos 68 e 30%, em controlo e *stress* respetivamente em comparação com o ensaio de maior intensidade luminosa durante a fase de crescimento. Relativamente a Dongjin, registou-se uma menor expressão de *OsDREB1B*, sob *stress* e luminosidade invariável, nomeadamente, menos 20% que no ensaio com maior luminosidade na fase de crescimento. Por outro lado, em condições controlo, Dongjin demonstrou ter maior expressão sob luminosidade constante (mais 73%) do que no ensaio com redução da intensidade luminosa. Especificamente, Dongjin, sob intensidade de luz constante, apresentou uma elevada expressão de *OsDREB1B* em condições controlo e uma expressão reduzida em condições de *stress*, o que não foi observado no ensaio com redução de intensidade de luz. Uma hipótese possível para a baixa expressão de *OsDREB1B* no controlo de Dongjin, ao reduzir a intensidade luminosa, é a de que acaba por não haver necessidade por parte das plantas de repor o número de transcritos até estímulo em contrário, uma vez que, havendo uma presença prévia de um elevado número de transcritos e mantendo-se a temperatura, o gene não foi necessariamente mais induzido. Adicionalmente, ao reduzir a intensidade luminosa houve uma diminuição da excitação termodinâmica, e consequentemente da expressão de *OsDREB1B*, justificando-se que tenha havido uma redução do número de transcritos, antes que estes fossem repostos pelo sistema transcricional. Em condições de *stress* a necessidade de repor o número de transcritos foi realçada pelo frio e pela redução da intensidade luminosa, pelo que a sobre-

expressão foi muito induzida (ao contrário da resposta observada no controlo). Em condições de *stress*, a dupla redução de excitação termodinâmica, nomeadamente a redução de intensidade de luz e de temperatura, podem ter contribuído conjuntamente para uma expressão anormalmente elevada do gene em Dongjin. Resumidamente, em condições de luminosidade constante, Dongjin apresenta geralmente maiores níveis de expressão de *OsDREB1B* que Nipponbare, mas neste caso, por ser esse o seu comportamento normal, em temperatura controlo não houve uma necessidade de aumentar a expressão de *OsDREB1B* ao reduzir-se a intensidade de luz incidente, pois já haveria um número considerável de transcritos. Uma hipótese plausível é de que a expressão de *OsDREB1B* seja adicionalmente induzida pela redução súbita da intensidade luminosa (uma vez que terá sido a única diferença entre ensaios), justificando o maior número de transcritos tanto para Nipponbare em controlo e *stress*, como para Dongjin sob *stress*; no caso de Dongjin, a redução de transcritos de *OsDREB1B* em controlo, após redução de luminosidade, poderá ter sido causada pela manutenção da temperatura e o elevado número de transcritos previamente presente. Adicionalmente, o maior número de transcritos, em condições controlo e de luminosidade constante mostra que para condições luminosas invariáveis existe uma maior expressão basal de *OsDREB1B* em Dongjin. Um maior número de transcritos pode indicar que, em Dongjin, este gene é regulado por um sistema de *negative-feedback loop*, ou seja, a presença de um maior número de transcritos poderá atuar como precursor para a metilação de DNA no promotor de *OsDREB1B*, tal como se pode ver pela menor sobre-expressão deste gene em Dongjin. Uma maior indução em condições controlo, com uma menor sobre-expressão em condições de *stress*, tal como se pôde observar para Dongjin em condições de luminosidade constante, denunciam um efeito retroactivo por parte de *OsDREB1B*. Considerando que a expressão de *OsDREB1B* está envolvida na resposta/tolerância a baixas temperaturas [Ito *et al.*, 2006] e tendo em conta a maior atividade transcricional do gene em Dongjin, relacionada com maior acessibilidade de regiões do promotor a complexos transcricionais, é possível que Dongjin seja mais apta a tolerar baixas temperaturas. Ambas as espécies, Dongjin e Nipponbare, são tolerantes ao *stress* de frio [Jiang *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2009], mas provavelmente com tolerâncias diferentes conforme a incidência do *stress*. Uma vez que o *stress* de frio tem muitos envolventes intracelulares, será de esperar que não exista uma só escala de tolerância.

2. A indução da expressão do gene *OsDREB1B* pode ser correlacionada com o padrão de modificações de histonas

Com o intuito de estabelecer correlações entre padrões de expressão *OsDREB1B* e modificações de histonas, procurou-se decifrar o padrão de marcas histónicas nomeadamente de H4K5ac, e H3K9ac ao nível de regiões específicas do promotor do gene.

Na literatura, a marca H4K5ac tem sido associada a genes importantes na definição da especificidade celular impedindo a compactação destas regiões da cromatina durante a mitose e assegurando uma transcrição rápida [Zhao *et al.*, 2011]. Adicionalmente, a marca H4K5ac foi associada à interface meristema proximal - região de alongação e em tecidos vasculares de *Arabidopsis*, sendo hipotética a sua relação com a diferenciação celular [Braszewska-Zalewska *et al.*, 2013]. Em milho, a marca H4K5ac está associada a genes de regulação do ciclo celular sob *stresses* abióticos [Zhao *et al.*, 2014] e em ratos está correlacionada com genes expressos durante a aprendizagem [Park *et al.*, 2013] sugerindo uma possível relevância desta marca com o processo de aclimação a *stresses* abióticos. Neste trabalho, a marca H4K5ac tem uma presença reduzida em Dongjin, nas regiões analisadas F/R4, 3 e 2 e nas condições testadas enquanto que em Nipponbare, tem uma presença relativamente maior na região F/R2 (de -280 a -121 pb) sob condições de *stress*, sugerindo que nesta linha a expressão de *OsDREB1B* possa estar relacionada com uma expressão diferenciadamente induzida, ou eventualmente com um processo de aclimação.

No que diz respeito à marca H3K9ac, os resultados de imunoprecipitação mostram que, na região de F/R4 (de -519 a -355 pb), Dongjin apresenta presença 8 vezes maior em controlo e 2.5 vezes mais em stress do que Nipponbare. Considerando que a marca H3K9ac está associada a promotores de genes com estado de cromatina permissiva para transcrição [Karmodiya *et al.*, 2012] e que em Nipponbare foi identificado nesta região um sítio de ligação para um factor de transcrição repressor [Figueiredo *et al.*, 2012] é plausível colocar a hipótese de que em Dongjin o efeito repressivo do factor de transcrição seja limitado pela presença de H3K9ac em condições controlo, e que a expressão de *OsDREB1B* seja promovida pela histona acetilada. É ainda possível que o efeito repressor do factor de transcrição em Nipponbare, não só não se apresente em Dongjin, como também a regulação de *OsDREB1B* em Dongjin possa ser influenciada em maior extensão pelo número de transcritos, e hipoteticamente por um sistema de *negative-feedback loop* de metilação com siRNA repressor - ou RdDM (*RNA-directed DNA methylation*) (Figura 21). Esta possibilidade é reforçada pela maior permissividade transcricional na região F/R4 de Dongjin em controlo comparativamente a uma condição de *stress* o que está de acordo com a predominância da marca H3K9ac, cerca de 4 vezes mais, em condições controlo e com os resultados de expressão do gene em Dongjin no ensaio com condições de luz invariáveis.

Igualmente corroborante de uma regulação epigenética mais transcricionalmente ativa em Dongjin, devido ao maior número de transcritos, é o facto de esta linha apresentar também uma maior incidência da marca H3K9ac em F/R2 e 3 (de -280 a -121 e de -394 a -227 pares de bases relativas ao ATG do promotor de *OsDREB1B* respectivamente) sugerindo que na região de -519 a -121 pares de bases do promotor a estrutura da cromatina possa ser mais descompactada em Dongjin que em Nipponbare.

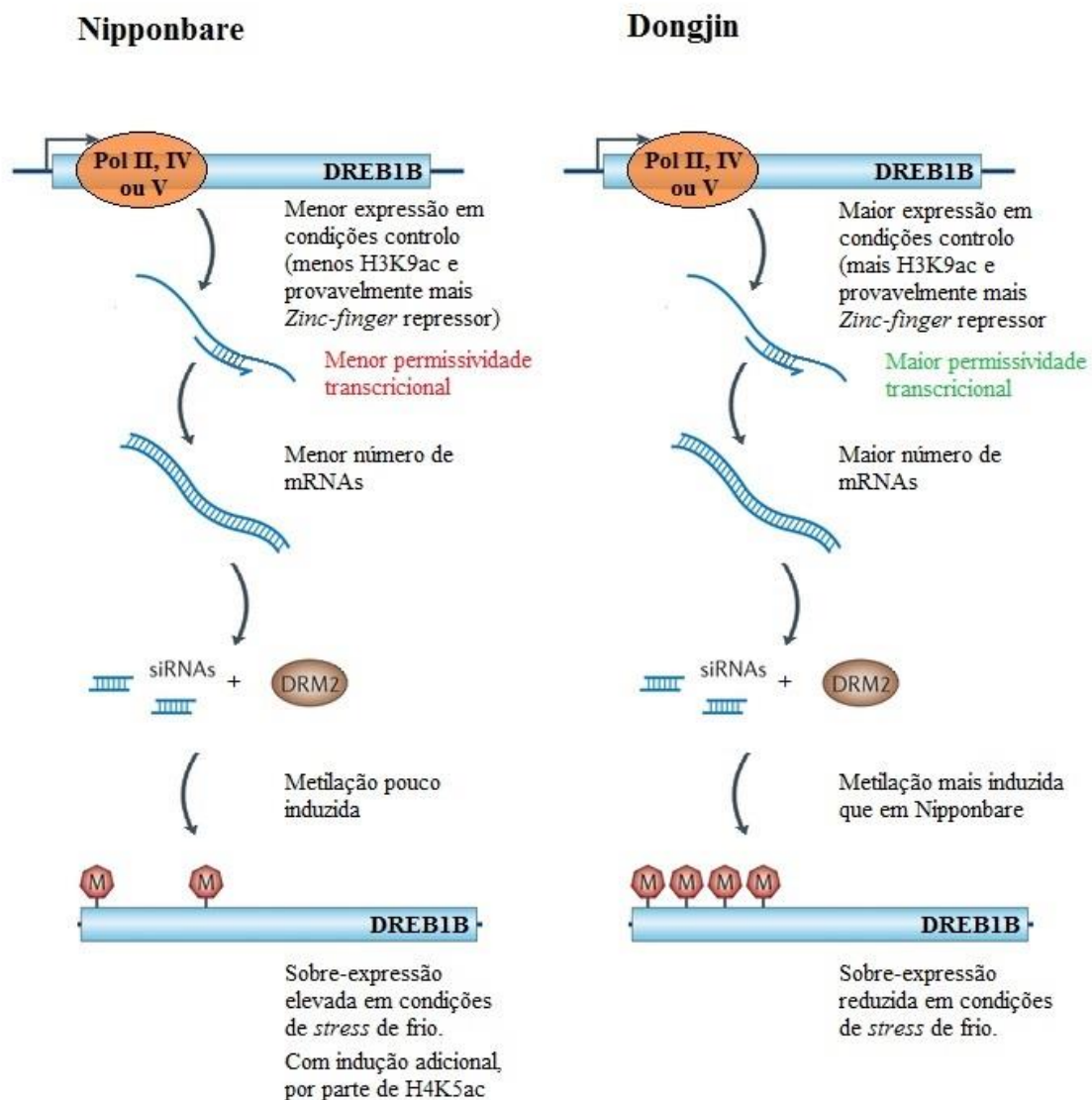


Figura 21 - Hipótese para a regulação diferencial do gene *OsDREB1B* em Nipponbare versus Dongjin.

3. A indução da expressão do gene *OsDREB1B* em resposta ao frio é potenciada pela presença de epimutações

Os dois mutantes estudados, HAC704 e DMT706, são *knockouts* de uma acetiltransferase histónica (*oshac704*) e de uma *de novo* metiltransferase de DNA (*osdrm2*) respectivamente, e são ferramentas importantes para a compreensão da influência destas epi-enzimas na regulação epigenética de genes específicos. Uma vez que a metilação de DNA, quando localizada em regiões promotoras de genes, é geralmente uma marca associada à repressão transcricional [Suzuki e Bird, 2008] é expectável que a mutação *osdrm2* esteja associada a hipometilação do DNA e subsequente aumento de expressão de genes específicos. O presente estudo de expressão do gene *OsDREB1B* no mutante DMT706 revelou níveis de sobre-expressão mais elevados (~4 vezes mais) de *OsDREB1B* em *stress* de frio que em Dongjin (*wt*) sugerindo que a metilação possa ter um papel relevante na regulação epigenética deste gene. Adicionalmente, pode também haver o envolvimento de siRNA ou ncRNA na metilação de DNA (*RNA-directed DNA Methyltransferase*) [Sharma *et al.*, 2009; Moritoh *et al.*, 2012] sendo também possível que a maior sobre expressão do gene seja uma consequência indireta da ausência de *OsDRM2*. São, no entanto, necessárias mais análises para confirmar o envolvimento de *OsDRM2* na metilação da região promotora de *OsDREB1B*.

No *knockout* de *oshac704* é expectável um fenótipo molecular de hipoacetilação global e subsequente redução de níveis de expressão de genes específicos, dado a acetilação histónica estar geralmente associada a uma maior permissividade transcricional, de promotores/genes onde existam estas marcas. No entanto, no presente estudo, a sobre-expressão de *OsDREB1B* apresentou-se mais elevada em HAC704 (mutante) do que em Dongjin, registando-se um incremento de aproximadamente 1.5 vezes. Considerando que em arroz existem oito acetiltransferases [Liu *et al.*, 2012] é possível que haja um efeito compensatório entre diferentes acetiltransferases pelo que os níveis globais de acetilação podem não ser substancialmente alterados.

4. Alteração da paisagem histónica em mutantes epigenéticos

Neste estudo procuramos avaliar se a presença de epimutações específicas poderá influenciar o padrão de modificações de histonas do promotor de *OsDREB1B*. Ambos os mutantes apresentam *%input* bastante reduzidas para a marca H3K9ac. Os dois fragmentos nos quais Dongjin apresentava maior incidência de H3K9ac (F/R1 e 4, [-151; -3] e [-519; -355] respectivamente) apresentaram-se, nas linhas mutantes, com níveis aproximadamente basais

destas marcas. Assim sendo, a sobre-expressão de *OsDREB1B* nos mutantes poderá não ser determinada pela marca H3K9ac.

No que diz respeito à marca H4K5ac em Dongjin e mutantes, registaram-se *%input* muito baixas. A linha DMT706 foi a que apresentou valores mais altos da marca H4K5ac particularmente na proximidade do ATG em condições controlo, aumentando gradualmente à medida que a distância aumenta em relação ao sítio de início da transcrição. Em contraste, a linha HAC704 apresenta, maior incidência da marca H4K5ac na proximidade do ATG em condições de *stress* de frio, e um aumento nas restantes regiões em condições controlo. No entanto, a marca H4K5ac não apresentou indícios de incidência relevante em Dongjin, HAC704 ou DMT706, sendo os valores similares aos mais baixos registados em Nipponbare sugerindo que a indução de sobre-expressão de *OsDREB1B* poderá não estar relacionada com a presença desta marca e portanto a indução deste gene poderá depender de outras marcas ou outros mecanismos adicionais. Num sistema em que exista uma deficiência enzimático-funcional de descompactação da cromatina, como poderá acontecer na linha HAC704, é expectável que existam outros mecanismos de descompactação que permitam uma acessibilidade viável aos genes por parte da maquinaria transcricional. O efeito da mutação *oshac704* pode ser compensado pela existência das diferentes acetilases histónicas identificadas em arroz [Liu *et al.*, 2012].

A linha DMT706, com a mutação *osdrm2*, uma *de novo* metiltransferase de DNA, pode ser um outro exemplo de um organismo com mecanismos de tolerância à insuficiência regulatória da estrutura da cromatina pois está patente a falta de uma enzima muito importante para a metilação *de novo* de DNA que permite a atribuição de grupos metilo em todos os contextos de sequência (periferia de citosinas), e na manutenção de metilação em grupos não-CG [Cao e Jacobsen, 2002a; Cao *et al.*, 2003]. Muito embora a frequência de plantas viáveis seja afetada, é possível que ocorra um novo estabelecimento de homeostase celular de forma a manter uma relação funcional entre metabolismo e expressão genética, que seja permissivo à variação necessária da estrutura da cromatina como forma de regular a expressão de genes. A linha DMT706 apresenta uma taxa de sobrevivência bastante reduzida (19%) e elevada sobre-expressão de *OsDREB1B* (maior que em HAC704), o que indica que esta enzima apresenta um papel relevante na regulação genética (Figura 22). Assim sendo, uma nova homeostase, estabelecida para uma estrutura funcional da cromatina, apresenta provavelmente uma permissividade transcricional mais generalizada pois a metilação de DNA é mais estável e abrangente que as modificações histónicas (aplicadas por OsHAC704 por exemplo). Apesar de existirem 10 metiltransferases [Sharma *et al.*, 2009] e oito acetiltransferases [Liu *et al.*, 2012] identificadas em arroz, é justificável que a taxa de sobrevivência no mutante HAC704 tenha sido maior que a de DMT706 (50 contra 19%) pois esta modificação faz parte de um mecanismo epiregulador menos abrangente e específico, enquanto OsDRM2 faz parte de um grupo mais restrito de metiltransferases (as *de novo* metiltransferases) com funções particularmente importantes no

funcionamento celular. Portanto, é expectável que em DMT706 ocorra não só um aumento de expressão de *OsDREB1B*, mas também de muitos outros genes cuja metilação de DNA terá sido parcialmente diminuída. Esta hipótese justifica a reduzida taxa de sobrevivência na linha DMT706 bem como a elevada sobre-expressão de *OsDREB1B* nesta linha pois poderá envolver uma maior pressão sobre os sistemas de regulação (epi)genética.

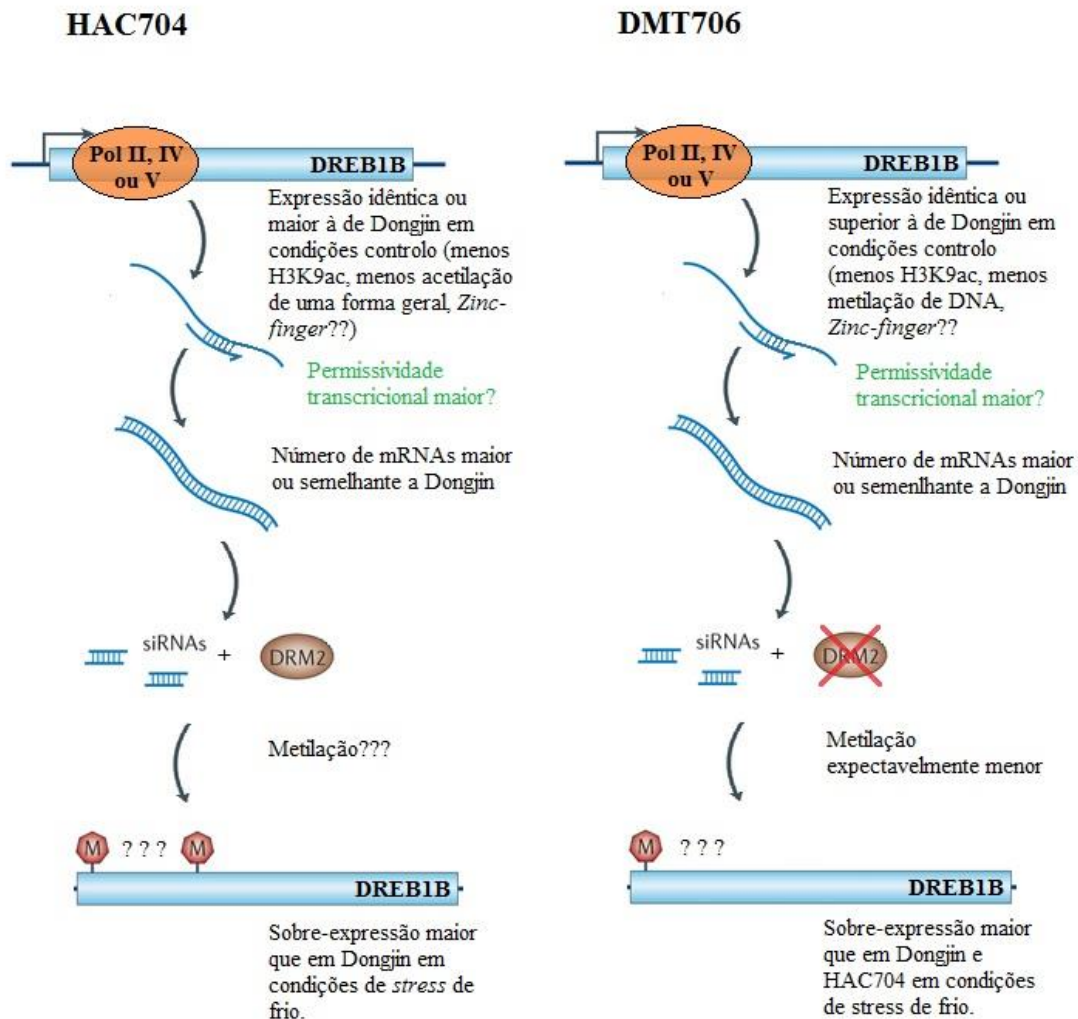


Figura 22 - Hipótese para a regulação diferencial do gene *OsDREB1B* na presença de epimutações.

5. A indução da expressão do gene *OsDREB1B* em resposta ao frio é influenciada pelo tratamento com drogas remodeladoras da cromatina

A 5-azacitidina é uma droga que se incorpora em RNA e DNA, e consequentemente provoca alterações das marcas epigenéticas estabelecidas nomeadamente, hipometilação global do DNA e rearranjo da cromatina [Santos *et al.*, 2002] podendo também ter efeitos na paisagem histónica causando a perda de histonas metiladas [Komashko *et al.*, 2010]. A tricostatina A, é uma droga inibidora de desacetilases que induz a hiperacetilação das histonas.

Neste estudo, o tratamento com 5-azacitidina (5-AC) causou alterações na expressão de *OsDREB1B* nomeadamente, Dongjin e mutantes apresentam um declive de sobre-expressão de *OsDREB1B* semelhante ao observado no tratamento de frio, na ausência de droga. A 5-AC tem uma ação repressora de *OsDREB1B*, mas não de forma específica sugerindo que a regulação deste gene seja influenciada por outros mecanismos reguladores. A tricostatina A, por outro lado, apresenta uma normalização generalizada da expressão e sobre-expressão de *OsDREB1B*, em todas as linhas estudadas sendo os valores de amplificação de expressão relativamente semelhantes entre si, independentemente do *background* genético ou epigenético. Em milho, a droga TSA foi referida como sendo capaz de inibir seletivamente a transcrição do gene *DREB1* que é fortemente induzido por frio [Hu *et al.*, 2011]. Neste trabalho, esta droga causou uma indução da expressão de *OsDREB1B* o que estará relacionado com o efeito hiperacetilante e indutor de permissividade transcricional da cromatina desta droga.

VI - Conclusões e Perspetivas futuras

Com o presente trabalho concluiu-se que o *stress* de frio (4 °C) induz a expressão de *OsDREB1B* em todas as linhas analisadas, sendo a sobre-expressão do gene maior em Nipponbare que nos restantes genótipos. Na presença de epimutações, nomeadamente os *knockouts* de *osdrm2* (DMT706) e de *oshac704* (HAC704) o gene *OsDREB1B* é mais expresso do que em Dongjin (*wt*), sendo que a indução da expressão em resposta ao frio foi maior em DMT706 que em HAC704. Relativamente ao padrão de marcas histónicas ao longo do promotor de *OsDREB1B*, Nipponbare e Dongjin apresentaram diferenças. Dongjin registou uma maior predominância da marca H3K9ac na região de -519 a -355 pares de bases em relação ao ATG em condições controlo (28 °C) enquanto Nipponbare possui maior presença de H4K5ac na região de -280 a -121 pares de bases sob *stress* de frio (4 °C) sugerindo que a regulação epigenética de *OsDREB1B* seja influenciado pelo genótipo. No caso dos epi-mutantes (HAC704 e DMT706) registou-se um empobrecimento das marcas histónicas testadas sugerindo que a expressão de *OsDREB1B* não depende necessariamente da presença de *OsDRM2* nem de *OsHAC704* para a sua sobre-expressão em condições de *stress* de frio.

No que diz respeito a perspetivas futuras, seria importante a análise simultânea de diferentes marcas e de uma forma integrada com a especificidade celular. O sistema de micro-fluídica desenvolvido para células de animais, pode permitir decifrar com melhor qualidade e precisão diferentes marcas histónicas em simultâneo. Novas abordagens no estudo de marcas epigenéticas podem também passar pelo estudo de marcas contextualizantes, como é o caso da glutationilação histónica, uma marca com grande abrangência e relevância intracelular, que nos permite interligar respostas epigenéticas adaptativas com estados energéticos variáveis. O envolvimento da glutationilação histónica na resposta epigenética a *stresses* pode ser um bom indicador tanto de respostas a *stresses*, como um possível normalizador entre respostas cruzadas como no caso do *stress* osmótico com o *stress* de frio, ou ainda um delator de diferentes estados energéticos celulares, que podem influenciar não só as respostas a *stress* como a atribuição de outras marcas epigenéticas.

VII - Bibliografia

- Agarwal, Manu, et al. "A R2R3 type MYB transcription factor is involved in the cold regulation of CBF genes and in acquired freezing tolerance." *Journal of Biological Chemistry* 281.49 (2006): 37636-37645.
- Allen, R. Cutler, et al. "Methylation of HpaII and HhaI sites near the polymorphic CAG repeat in the human androgen-receptor gene correlates with X chromosome inactivation." *American journal of human genetics* 51.6 (1992): 1229.
- Allis, C. David, et al., eds. *Epigenetics*. Cold Spring Harbor, NY:: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2007.
- Ambrosone, Alfredo, et al. "Beyond transcription: RNA-binding proteins as emerging regulators of plant response to environmental constraints." *Plant Science* 182 (2012): 12-18.
- Aquea, Felipe, Tania Timmermann, and Patricio Arce-Johnson. "Analysis of histone acetyltransferase and deacetylase families of *Vitis vinifera*." *Plant Physiology and Biochemistry* 48.2 (2010): 194-199.
- Baker, Stokes S., Kathy S. Wilhelm, and Michael F. Thomashow. "The 5'-Region of *Arabidopsis thaliana* cor15a Has Cis-Acting Elements That Confer Cold-, Drought-and ABA-Regulated Gene Expression." *Plant molecular biology* 24.5 (1994): 701-713.
- Bannister, Andrew J., and Tony Kouzarides. "Regulation of Chromatin by Histone Modifications." *Cell research* 21.3 (2011): 381-395.
- Barski, Artem et al. "High-Resolution Profiling of Histone Methylations in the Human Genome." *Cell* 129.4 (2007): 823-837.
- Belmont, Andrew S. "Large-Scale Chromatin Organization: The Good, the Surprising, and the Still Perplexing." *Current Opinion in Cell Biology* 26 (2014): 69-78.
- Belyaev, Igor Y., and Eugene D. Alipov. "Frequency-dependent effects of ELF magnetic field on chromatin conformation in *Escherichia coli* cells and human lymphocytes." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 1526.3 (2001): 269-276.
- Berger, Shelley L. "The Complex Language of Chromatin Regulation during Transcription." *Nature* 447.7143 (2007): 407-412.
- Bergman, Per, et al. "Male-sterile tobacco displays abnormal mitochondrial atp1 transcript accumulation and reduced floral ATP/ADP ratio." *Plant molecular biology* 42.3 (2000): 531-544.
- Bierlen, Ralph, Eric James Wailes, and Gail L. Crammer. *The Mercosur rice economy*. Vol. 954. Arkansas Agricultural Experiment Station, 1997.
- Braszewska-Zalewska, Agnieszka J., et al. "Tissue-specific epigenetic modifications in root apical meristem cells of *Hordeum vulgare*." *PloS one* 8.7 (2013).
- Brown, Christopher R. et al. "Linking Stochastic Fluctuations in Chromatin Structure and Gene Expression." Ed. Oliver J. Rando. *PLoS Biology* 11.8 (2013): e1001621.
- Bouman, B.A.M. et al. "Rice and Water." *Advances in Agronomy*. Vol. 92. Elsevier, 2007. 187-237. *CrossRef*. Web. 19 Oct. 2015.
- Bruinsma, Robijn et al. "Chromatin Hydrodynamics." *Biophysical Journal* 106.9 (2014): 1871-1881.
- Callaway, Ewen. "Domestication: The birth of rice." *Nature* 514.7524 (2014): S58-S59.
- Cao, Xiaofeng, and Steven E. Jacobsen. "Role of the *Arabidopsis* DRM Methyltransferases in de Novo DNA Methylation and Gene Silencing." *Current Biology* 12.13 (2002): 1138-1144.
- Cao, Xiaofeng, and Steven E. Jacobsen. "Role of the *Arabidopsis* DRM methyltransferases in de novo DNA methylation and gene silencing." *Current Biology* 12.13 (2002): 1138-1144.
- Cao, Xiaofeng, et al. "Role of the DRM and CMT3 methyltransferases in RNA-directed DNA methylation." *Current biology* 13.24 (2003): 2212-2217.
- Chinnusamy, V. "ICE1: A Regulator of Cold-Induced Transcriptome and Freezing Tolerance in *Arabidopsis*." *Genes & Development* 17.8 (2003): 1043-1054.
- Chinnusamy, V. "Molecular Genetic Perspectives on Cross-Talk and Specificity in Abiotic Stress Signalling in Plants." *Journal of Experimental Botany* 55.395 (2003): 225-236.

- Chinnusamy, Viswanathan, Jianhua Zhu, and Jian-Kang Zhu. "Cold stress regulation of gene expression in plants." *Trends in plant science* 12.10 (2007): 444-451.
- Chinnusamy, Viswanathan, Jian-Kang Zhu, and Ramanjulu Sunkar. "Gene Regulation During Cold Stress Acclimation in Plants." *Plant Stress Tolerance*. Ed. Ramanjulu Sunkar. Vol. 639. Totowa, NJ: Humana Press, 2010. 39–55.
- Chua, Yii Leng, Anthony PC Brown, and John C. Gray. "Targeted Histone Acetylation and Altered Nuclease Accessibility over Short Regions of the Pea Plastocyanin Gene." *The Plant Cell* 13.3 (2001): 599–612.
- Clayton, S., and P. C. Neves. "Country snapshot: Brazil." *Rice Today* 10 (2011): 16-17.
- Clarke, Duncan J., Laura P. O'Neill, and Bryan M. Turner. "Selective Use of H4 Acetylation Sites in the Yeast *Saccharomyces Cerevisiae*." *Biochem. J* 294 (1993): 557–561.
- Close, Pierre et al. "The Emerging Role of Lysine Acetylation of Non-Nuclear Proteins." *Cellular and Molecular Life Sciences* 67.8 (2010): 1255–1264.
- Cosgrove, Michael S. "PHinDing a New Histone 'Effector' Domain." *Structure* 14.7 (2006): 1096–1098.
- Cruz, Renata Pereira da et al. "Avoiding Damage and Achieving Cold Tolerance in Rice Plants." *Food and Energy Security* 2.2 (2013): 96–119.
- Dangwal, Meenakshi et al. "De Novo Methyltransferase, OsDRM2, Interacts with the ATP-Dependent RNA Helicase, OseIF4A, in Rice." *Journal of Molecular Biology* 425.16 (2013): 2853–2866.
- Davies, Emma et al. "Ultra-High Resolution Imaging of DNA and Nucleosomes Using Non-Contact Atomic Force Microscopy." *FEBS Letters* 579.7 (2005): 1702–1706.
- Desyatnikov, Anton S., et al. "Spontaneous knotting of self-trapped waves." *Scientific reports* 2 (2012).
- Ding, Jiandong, Shuigeng Zhou, and Jihong Guan. "Finding MicroRNA Targets in Plants: Current Status and Perspectives." *Genomics, Proteomics & Bioinformatics* 10.5 (2012): 264–275.
- Doherty, Colleen J., et al. "Roles for Arabidopsis CAMTA transcription factors in cold-regulated gene expression and freezing tolerance." *The Plant Cell* 21.3 (2009): 972-984.
- Dolinoy, Dana C. et al. "Variable Histone Modifications at the A^{vy} Metastable Epiallele." *Epigenetics* 5.7 (2010): 637–644.
- Dong, Chun-Hai, et al. "The negative regulator of plant cold responses, HOS1, is a RING E3 ligase that mediates the ubiquitination and degradation of ICE1." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103.21 (2006): 8281-8286.
- Dong, Malia A., Eva M. Farré, and Michael F. Thomashow. "Circadian clock-associated 1 and late elongated hypocotyl regulate expression of the C-repeat binding factor (CBF) pathway in Arabidopsis." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108.17 (2011): 7241-7246.
- Dubouzet, Joseph G. et al. "OsDREB Genes in Rice, *Oryza Sativa* L., Encode Transcription Activators That Function in Drought-, High-Salt-and Cold-Responsive Gene Expression." *The Plant Journal* 33.4 (2003): 751–763.
- Escamilla-Del-Arenal, M. et al. "Cdy1, a New Partner of the Inactive X Chromosome and Potential Reader of H3K27me3 and H3K9me2." *Molecular and Cellular Biology* 33.24 (2013): 5005–5020.
- Fairhurst, T., and A. Dobermann. "Rice in the Global Food Supply." *World* 5.7,502 (2002): 454–349.
- Farrell, T. C., R. L. Williams, and S. Fukai. "The cost of low temperature to the NSW rice industry." *Proceeding of the 10th Australian Agronomy Conference, Hobart, Australia*. Vol. 28. 2001.
- Ferreira, Liliana J. et al. "Salt Tolerant and Sensitive Rice Varieties Display Differential Methylome Flexibility under Salt Stress." Ed. Niranjan Baisakh. *PLOS ONE* 10.5 (2015): e0124060. doi:10.1371/journal.pone.0124060.
- Figueiredo, D. D. et al. "Seven Zinc-Finger Transcription Factors Are Novel Regulators of the Stress Responsive Gene OsDREB1B." *Journal of Experimental Botany* 63.10 (2012): 3643–3656.
- Foyer, Christine H., et al. "Hydrogen peroxide-and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling." *Physiologia Plantarum* 100.2 (1997): 241-254.
- Frommer, Marianne, et al. "A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89.5 (1992): 1827-1831.

- Fuchs, Jörg et al. "Chromosomal Histone Modification Patterns – from Conservation to Diversity." *Trends in Plant Science* 11.4 (2006): 199–208.
- García-Giménez, José L., and Federico V. Pallardó. "Maintenance of glutathione levels and its importance in epigenetic regulation." *Frontiers in pharmacology* 5 (2014).
- Ge, Liang-Fa, et al. "Overexpression of the trehalose-6-phosphate phosphatase gene OsTPP1 confers stress tolerance in rice and results in the activation of stress responsive genes." *Planta* 228.1 (2008): 191-201.
- Ghildiyal, Megha, and Phillip D. Zamore. "Small Silencing RNAs: An Expanding Universe." *Nature Reviews Genetics* 10.2 (2009): 94–108.
- Gilmour, Sarah J., et al. "Low temperature regulation of the Arabidopsis CBF family of AP2 transcriptional activators as an early step in cold-induced COR gene expression." *The Plant Journal* 16.4 (1998): 433-442.
- Glaszmann, J. C., R. N. Kaw, and G. S. Khush. "Genetic divergence among cold tolerant rices (*Oryza sativa* L.)." *Euphytica* 45.2 (1990): 95-104.
- Gong, Zhizhong, et al. "A DEAD box RNA helicase is essential for mRNA export and important for development and stress responses in Arabidopsis." *The Plant Cell* 17.1 (2005): 256-267.
- Goldberg, Aaron D., C. David Allis, and Emily Bernstein. "Epigenetics: a landscape takes shape." *Cell* 128.4 (2007): 635-638.
- Green, Douglas R., and John C. Reed. "Mitochondria and apoptosis." *Science* 281.5381 (1998): 1309.
- Grifo, J. A. et al. "Characterization of Eukaryotic Initiation Factor 4A, a Protein Involved in ATP-Dependent Binding of Globin mRNA." *Journal of Biological Chemistry* 257.9 (1982): 5246–5252.
- Groudine, M., Eisenman, R. & Weintraub, H. "Chromatin structure of endogenous retroviral genes and activation by an inhibitor of DNA methylation." *Nature* 292 (1981): 311–317.
- Guo, Yan, et al. "An Arabidopsis mutation in translation elongation factor 2 causes superinduction of CBF/DREB1 transcription factor genes but blocks the induction of their downstream targets under low temperatures." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99.11 (2002): 7786-7791.
- Gutha, Linga Reddy, and Arjula R. Reddy. "Rice DREB1B promoter shows distinct stress-specific responses, and the overexpression of cDNA in tobacco confers improved abiotic and biotic stress tolerance." *Plant molecular biology* 68.6 (2008): 533-555.
- Habibur Rahman Pramanik, M., and Ryozyo Imai. "Functional Identification of a Trehalose 6-Phosphate Phosphatase Gene That Is Involved in Transient Induction of Trehalose Biosynthesis during Chilling Stress in Rice." *Plant Molecular Biology* 58.6 (2005): 751–762.
- Han, Joonhee, et al. "Pre-mRNA splicing: where and when in the nucleus." *Trends in cell biology* 21.6 (2011): 336-343.
- Hannah, Matthew A., Arnd G. Heyer, and Dirk K. Hincha. "A global survey of gene regulation during cold acclimation in Arabidopsis thaliana." *PLoS Genet* 1.2 (2005): e26.
- Haring, Max et al. "Chromatin Immunoprecipitation: Optimization, Quantitative Analysis and Data Normalization." *Plant Methods* 3.1 (2007): 11.
- Hartl, Markus, and Iris Finkemeier. "Plant Mitochondrial Retrograde Signaling: Post-Translational Modifications Enter the Stage." *Frontiers in Plant Science* 3 (2012): 253. *PMC*. Web. 18 Oct. 2015.
- Hayashi-Takanaka, Y. et al. "Visualizing Histone Modifications in Living Cells: Spatiotemporal Dynamics of H3 Phosphorylation during Interphase." *The Journal of Cell Biology* 187.6 (2009): 781–790.
- Helariutta, Yrjö et al. "Chalcone Synthase-like Genes Active during Corolla Development Are Differentially Expressed and Encode Enzymes with Different Catalytic Properties in *Gerbera hybrida* (Asteraceae)." *Plant molecular biology* 28.1 (1995): 47–60.
- Henderson, Ian R., et al. "The de novo cytosine methyltransferase DRM2 requires intact UBA domains and a catalytically mutated paralog DRM3 during RNA-directed DNA methylation in Arabidopsis thaliana." *PLoS Genet* 6.10 (2010): e1001182.
- Henderson, Ian R., and Steven E. Jacobsen. "Epigenetic Inheritance in Plants." *Nature* 447.7143 (2007): 418–424.
- Holliday, Robin. "The inheritance of epigenetic defects." *Science* 238.4824 (1987): 163-170.
- Hundertmark, Michaela, and Dirk K. Hincha. "LEA (late embryogenesis abundant) proteins and their encoding genes in Arabidopsis thaliana." *BMC genomics* 9.1 (2008): 118.

- Huner, Norman PA, Gunnar Öquist, and Fathey Sarhan. "Energy Balance and Acclimation to Light and Cold." *Trends in Plant Science* 3.6 (1998): 224–230.
- Hu, Yong, et al. "Trichostatin A selectively suppresses the cold-induced transcription of the ZmDREB1 gene in maize." *PLoS One* 6.7 (2011): e22132.
- Ingram, J., and D1 Bartels. "The molecular basis of dehydration tolerance in plants." *Annual review of plant biology* 47.1 (1996): 377-403.
- Ikeda, Yoko, and Tetsu Kinoshita. "DNA Demethylation: A Lesson from the Garden." *Chromosoma* 118.1 (2009): 37–41.
- Ito, Y. "Functional Analysis of Rice DREB1/CBF-Type Transcription Factors Involved in Cold-Responsive Gene Expression in Transgenic Rice." *Plant and Cell Physiology* 47.1 (2005): 141–153.
- Ivanov, A. G. et al. "Implications of Alternative Electron Sinks in Increased Resistance of PSII and PSI Photochemistry to High Light Stress in Cold-Acclimated Arabidopsis Thaliana." *Photosynthesis Research* 113.1-3 (2012): 191–206.
- Jablunka, Eva, and Marion J. Lamb. "The changing concept of epigenetics." *Annals of the New York Academy of Sciences* 981.1 (2002): 82-96.
- Jabs, Thorsten. "Reactive oxygen intermediates as mediators of programmed cell death in plants and animals." *Biochemical pharmacology* 57.3 (1999): 231-245.
- Jang, In-Cheol, et al. "Expression of a bifunctional fusion of the Escherichia coli genes for trehalose-6-phosphate synthase and trehalose-6-phosphate phosphatase in transgenic rice plants increases trehalose accumulation and abiotic stress tolerance without stunting growth." *Plant physiology* 131.2 (2003): 516-524.
- Jarillo, Jose A. et al. "Chromatin Remodeling in Plant Development." *The International Journal of Developmental Biology* 53.8-9-10 (2009): 1581–1596.
- Jasencakova, Zuzana et al. "Histone H4 Acetylation of Euchromatin and Heterochromatin Is Cell Cycle Dependent and Correlated with Replication rather than with Transcription." *The Plant Cell* 12.11 (2000): 2087–2100.
- Jayani, Ranveer S., Praveena L. Ramanujam, and Sanjeev Galande. "Studying histone modifications and their genomic functions by employing chromatin immunoprecipitation and immunoblotting." *Methods in cell biology* 98 (2010): 35-56.
- Jenuwein, Thomas, and C. David Allis. "Translating the histone code." *Science* 293.5532 (2001): 1074-1080.
- Jiang, Ling, et al. "QTL analysis of cold tolerance at seedling stage in rice (Oryza sativa L.) using recombination inbred lines." *Journal of Cereal Science* 48.1 (2008): 173-179.
- Jones, Alan. "Does the plant mitochondrion integrate cellular stress and regulate programmed cell death?" *Trends in plant science* 5.5 (2000): 225-230.
- Karmodiya, Krishanpal et al. "H3K9 and H3K14 Acetylation Co-Occur at Many Gene Regulatory Elements, While H3K14ac Marks a Subset of Inactive Inducible Promoters in Mouse Embryonic Stem Cells." *BMC genomics* 13.1 (2012): 424.
- Kato, S., H. Kosaka, and S. Hara. "On the affinity of rice varieties as shown by fertility of hybrid plants." *Bull Sci Fac Agric Kyushu Univ* 3 (1928): 132-147.
- Khush, Gurdev S. "Origin, Dispersal, Cultivation and Variation of Rice." *Oryza: From Molecule to Plant*. Springer, 1997. 25–34.
- Kidokoro, Satoshi, et al. "The phytochrome-interacting factor PIF7 negatively regulates DREB1 expression under circadian control in Arabidopsis." *Plant physiology* 151.4 (2009): 2046-2057.
- Kim, Sang-Ic, and Thomas H. Tai. "Evaluation of Seedling Cold Tolerance in Rice Cultivars: A Comparison of Visual Ratings and Quantitative Indicators of Physiological Changes." *Euphytica* 178.3 (2011): 437–447.
- Kim, Soo-Jin, et al. "Ectopic expression of a cold-responsive OsAsr1 cDNA gives enhanced cold tolerance in transgenic rice plants." *Molecules and cells* 27.4 (2009): 449-458.
- Kim, Jong-Myong, et al. "Chromatin changes in response to drought, salinity, heat, and cold stresses in plants." *Frontiers in plant science* 6 (2015).
- Kim, Jong-Myong, Taiko K. To, et al. "Chromatin Regulation Functions in Plant Abiotic Stress Responses." *Plant, Cell & Environment* 33.4 (2010): 604–611.

- Kim, S. et al. "SUPPRESSOR OF FRIGIDA4, Encoding a C2H2-Type Zinc Finger Protein, Represses Flowering by Transcriptional Activation of Arabidopsis FLOWERING LOCUS C." *The Plant Cell Online* 18.11 (2006): 2985–2998.
- Kim, Young Bae, et al. "Mechanism of cell cycle arrest caused by histone deacetylase inhibitors in human carcinoma cells." *The Journal of antibiotics* 53.10 (2000): 1191-1200.
- Kiyosue, Tomohiro, Kazuko Yamaguchi-Shinozaki, and Kazuo Shinozaki. "Characterization of two cDNAs (ERD10 and ERD14) corresponding to genes that respond rapidly to dehydration stress in Arabidopsis thaliana." *Plant and Cell Physiology* 35.2 (1994): 225-231.
- Knight, Marc R., et al. "Transgenic plant aequorin reports the effects of touch and cold-shock and elicitors on cytoplasmic calcium." *Nature* 352 (1991): 524-526.
- Kobayashi, Yuhko et al. "Absciscic Acid-Activated SNRK2 Protein Kinases Function in the Gene-Regulation Pathway of ABA Signal Transduction by Phosphorylating ABA Response Element-Binding Factors: TRAB1 Phosphorylation by SnRK2 Protein Kinases." *The Plant Journal* 44.6 (2005): 939–949.
- Komashko, Vitalina M., and Peggy J. Farnham. "5-azacytidine treatment reorganizes genomic histone modification patterns." *Epigenetics* 5.3 (2010): 229-240.
- Konsta, Orsia D., et al. "The contribution of epigenetics in Sjögren's Syndrome." *Frontiers in genetics* 5 (2014). Kornberg, R. D. and Klug, A. "The nucleosome." *Scientific American* 244 (1981): 52-64.
- Abdelhaleem, Mohamed, Lois Maltais, and Hester Wain. "The Human DDX and DHX Gene Families of Putative RNA Helicases." *Genomics* 81.6 (2003): 618–622.
- Kornberg, Roger. "The location of nucleosomes in chromatin: specific or statistical?" *Nature* 292 (1981): 579-580.
- Kornberg, Roger D. "Chromatin Structure: A Repeating Unit of Histones and DNA." *Science* 184.4139 (1974): 868–871.
- Kouzarides, Tony. "Chromatin Modifications and Their Function." *Cell* 128.4 (2007): 693–705.
- Kovacs, Denes, et al. "Chaperone activity of ERD10 and ERD14, two disordered stress-related plant proteins." *Plant physiology* 147.1 (2008): 381-390.
- Kozlov, G. et al. "Structural Basis of Ubiquitin Recognition by the Ubiquitin-Associated (UBA) Domain of the Ubiquitin Ligase EDD." *Journal of Biological Chemistry* 282.49 (2007): 35787–35795.
- Kurdistani, Siavash K., Saeed Tavazoie, and Michael Grunstein. "Mapping global histone acetylation patterns to gene expression." *Cell* 117.6 (2004): 721-733.
- Lan, Xianying et al. "Maternal Diet during Pregnancy Induces Gene Expression and DNA Methylation Changes in Fetal Tissues in Sheep." *Frontiers in Genetics* 4 (2013): n. pag. CrossRef. Web. 6 Nov. 2015.
- Lee, Moon-Hee, and others. "Low Temperature Tolerance in Rice: The Korean Experience." *ACIAR PROCEEDINGS*. ACIAR; 1998, 2001. 109–117.
- Lehnertz, Bernhard et al. "Suv39h-Mediated Histone H3 Lysine 9 Methylation Directs DNA Methylation to Major Satellite Repeats at Pericentric Heterochromatin." *Current Biology* 13.14 (2003): 1192–1200.
- Lennartsson, Andreas, and Karl Ekwall. "Histone Modification Patterns and Epigenetic Codes." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1790.9 (2009): 863–868.
- Li, Bing, Michael Carey, and Jerry L. Workman. "The Role of Chromatin during Transcription." *Cell* 128.4 (2007): 707–719.
- Li, Xin, et al. "Single-base resolution maps of cultivated and wild rice methylomes and regulatory roles of DNA methylation in plant gene expression." *BMC genomics* 13.1 (2012): 300.
- Lima, M. G. S., N. F. Lopes, P. D. Zimmer, G. E. Meneghello, C. R. Mendes, and L. Amarante. "Enzyme expression in indica and japonica rice cultivars under saline stress." *Acta Sci. Biol. Sci.* 34 (2012): 473–481.
- Liu, Ai-Ling et al. "Expression Profiles of Class A Rice Heat Shock Transcription Factor Genes Under Abiotic Stresses." *Journal of Plant Biology* 53.2 (2010): 142–149.
- Liu, Chih Long, et al. "Single-nucleosome mapping of histone modifications in *S. cerevisiae*." *PLoS biology* 3.10 (2005): 1753.

- Liu, Qiang et al. "Two Transcription Factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA Binding Domain Separate Two Cellular Signal Transduction Pathways in Drought-and Low-Temperature-Responsive Gene Expression, Respectively, in Arabidopsis." *The Plant Cell* 10.8 (1998): 1391–1406.
- Liu, Xia et al. "Histone Acetyltransferases in Rice (*Oryza Sativa* L.): Phylogenetic Analysis, Subcellular Localization and Expression." *BMC plant biology* 12.1 (2012): 145.
- Lohr, D. et al. "Using Atomic Force Microscopy to Study Chromatin Structure and Nucleosome Remodeling." *Methods* 41.3 (2007): 333–341.
- Lourenço, Tiago, et al. "Isolation and characterization of rice (*Oryza sativa* L.) E3-ubiquitin ligase OsHOS1 gene in the modulation of cold stress response." *Plant molecular biology* 83.4-5 (2013): 351-363.
- Lv, De-Kang et al. "Profiling of Cold-Stress-Responsive miRNAs in Rice by Microarrays." *Gene* 459.1-2 (2010): 39–47.
- Mackill, David J., and Xiaomao Lei. "Genetic variation for traits related to temperate adaptation of rice cultivars." *Crop Science* 37.4 (1997): 1340-1346.
- Martinez, Angel et al. "Mutually Tangled Colloidal Knots and Induced Defect Loops in Nematic Fields." *Nature Materials* 13.3 (2014): 258–263.
- Martín, Mariana Laura, and Liliana Busconi. "A Rice Membrane-Bound Calcium-Dependent Protein Kinase Is Activated in Response to Low Temperature." *Plant Physiology* 125.3 (2001): 1442–1449.
- Maruyama, Kyonoshin et al. "Identification of Cold-Inducible Downstream Genes of the *Arabidopsis* DREB1A/CBF3 Transcriptional Factor Using Two Microarray Systems." *The Plant Journal* 38.6 (2004): 982–993.
- Matzke, Marjori A., and Rebecca A. Mosher. "RNA-directed DNA methylation: an epigenetic pathway of increasing complexity." *Nature Reviews Genetics* 15.6 (2014): 394-408.
- Mauger, Jean-Pierre. "Role of the nuclear envelope in calcium signalling." *Biology of the Cell* 104.2 (2012): 70-83.
- Mellor, J. "Dynamic Nucleosomes and Gene Transcription." *Trends in Genetics* 22.6 (2006): 320–329.
- Mellor, Jane. "It Takes a PHD to Read the Histone Code." *Cell* 126.1 (2006): 22–24.
- Metzler, Ralf, and Andreas Hanke. *Knots, Bubbles, Unwinding, and Breathing: Probing the Topology of DNA and Other Biomolecules*. Handbook of theoretical and computational nanotechnology. American Scientific, California, 2005.
- Mittler, Ron, and Eduardo Blumwald. "Genetic engineering for modern agriculture: challenges and perspectives." *Annual review of plant biology* 61 (2010): 443-462.
- Miura, Asuka et al. "Mobilization of Transposons by a Mutation Abolishing Full DNA Methylation in Arabidopsis." *Nature* 411.6834 (2001): 212–214.
- Miura, Kenji, and Paul M. Hasegawa. "Sumoylation and other ubiquitin-like post-translational modifications in plants." *Trends in cell biology* 20.4 (2010): 223-232.
- Miura, Kenji, Jing Bo Jin, and Paul M Hasegawa. "Sumoylation, a Post-Translational Regulatory Process in Plants." *Current Opinion in Plant Biology* 10.5 (2007): 495–502.
- Moore, Lisa D, Thuc Le, and Guoping Fan. "DNA Methylation and Its Basic Function." *Neuropsychopharmacology* 38.1 (2013): 23–38.
- Moore, Lisa D., Thuc Le, and Guoping Fan. "DNA methylation and its basic function." *Neuropsychopharmacology* 38.1 (2013): 23-38.
- Moritoh, Satoru et al. "Targeted Disruption of an Orthologue of DOMAINS REARRANGED METHYLASE 2, OsDRM2, Impairs the Growth of Rice Plants by Abnormal DNA Methylation: osdrm2 Affects DNA Methylation and Development." *The Plant Journal* 71.1 (2012): 85–98.
- Mueller, Thomas D., and Juli Feigon. "Solution Structures of UBA Domains Reveal a Conserved Hydrophobic Surface for Protein–Protein Interactions." *Journal of Molecular Biology* 319.5 (2002): 1243–1255.
- Nakamura, Junya et al. "Rice Homologs of Inducer of CBF Expression (OsICE) Are Involved in Cold Acclimation." *Plant Biotechnology* 28.3 (2011): 303–309.
- Nakamura, Junya, et al. "Rice homologs of inducer of CBF expression (OsICE) are involved in cold acclimation." *Plant Biotechnology* 28.3 (2011): 303-309.

- Ndong, Christian, et al. "Survey of gene expression in winter rye during changes in growth temperature, irradiance or excitation pressure." *Plant Molecular Biology* 45.6 (2001): 691-703.
- Nicodemi, Mario, and Ana Pombo. "Models of Chromosome Structure." *Current Opinion in Cell Biology* 28 (2014): 90-95.
- Niedzwiecki, Megan M. et al. "Blood Glutathione Redox Status and Global Methylation of Peripheral Blood Mononuclear Cell DNA in Bangladeshi Adults." *Epigenetics* 8.7 (2013): 730-738.
- Nishiyama, Iwao. "Climatic influence on pollen formation and fertilization." *Biology of rice* (1984): 153-171.
- Oey, H., and E. Whitelaw. "On the Meaning of the Word 'epimutation.'" *Trends in Genetics* 30.12 (2014): 519-520.
- Örvar, Björn Lárus, et al. "Early steps in cold sensing by plant cells: the role of actin cytoskeleton and membrane fluidity." *The Plant Journal* 23.6 (2000): 785-794.
- Papaefthimiou, D., and A. S. Tsaftaris. "Characterization of a drought inducible trithorax-like H3K4 methyltransferase from barley." *Biologia Plantarum* 56.4 (2012): 683-692.
- Papeleu, Peggy, et al. "Trichostatin A induces differential cell cycle arrests but does not induce apoptosis in primary cultures of mitogen-stimulated rat hepatocytes." *Journal of hepatology* 39.3 (2003): 374-382.
- Park, C. Schwan, Hubert Rehrauer, and Isabelle M. Mansuy. "Genome-Wide Analysis of H4K5 Acetylation Associated with Fear Memory in Mice." *BMC genomics* 14.1 (2013): 539.
- Park, Hyeong Cheol et al. "Functional Characterization of the SIZ/PIAS-Type SUMO E3 Ligases, OsSIZ1 and OsSIZ2 in Rice: Characterization of SIZ/PIAS-Type SUMO E3 Ligases in Rice." *Plant, Cell & Environment* 33.11 (2010): 1923-1934.
- Qin, Feng et al. "Cloning and Functional Analysis of a Novel DREB1/CBF Transcription Factor Involved in Cold-Responsive Gene Expression in Zea Mays L." *Plant and Cell Physiology* 45.8 (2004): 1042-1052.
- Qin, Fu-Jun et al. "Rice SUVH Histone Methyltransferase Genes Display Specific Functions in Chromatin Modification and Retrotransposon Repression." *Molecular Plant* 3.4 (2010): 773-782.
- Qin, Qiu-lin, et al. "Isolation, optimization, and functional analysis of the cDNA encoding transcription factor OsDREB1B in Oryza Sativa L." *Molecular Breeding* 19.4 (2007): 329-340.
- Ramakers, Christian et al. "Assumption-Free Analysis of Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction (PCR) Data." *Neuroscience Letters* 339.1 (2003): 62-66.
- Reith, D. et al. "Effective Stiffening of DNA due to Nematic Ordering Causes DNA Molecules Packed in Phage Capsids to Preferentially Form Torus Knots." *Nucleic Acids Research* 40.11 (2012): 5129-5137.
- Renaut, Jenny, Jean-Francois Hausman, and Michael E. Wisniewski. "Proteomics and low-temperature studies: bridging the gap between gene expression and metabolism." *Physiologia Plantarum* 126.1 (2006): 97-109.
- Rougeulle, C. et al. "Differential Histone H3 Lys-9 and Lys-27 Methylation Profiles on the X Chromosome." *Molecular and Cellular Biology* 24.12 (2004): 5475-5484.
- Roy, Dipan, et al. "Differential Acetylation of Histone H3 at the Regulatory Region of OsDREB1b Promoter Facilitates Chromatin Remodelling and Transcription Activation during Cold Stress." *PLoS ONE* 9.6 (2014): e100343.
- Russo, Vincenzo EA, Robert A. Martienssen, and Arthur D. Riggs. *Epigenetic mechanisms of gene regulation*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996.
- Sahar, Saurabh, and Paolo Sassone-Corsi. "The epigenetic language of circadian clocks." *Circadian clocks*. Springer Berlin Heidelberg, 2013. 29-44.
- Sanghera, Gulzar S. et al. "Engineering Cold Stress Tolerance in Crop Plants." *Current genomics* 12.1 (2011): 30.
- Sangwan, Veena, et al. "Cold-activation of Brassica napus BN115 promoter is mediated by structural changes in membranes and cytoskeleton, and requires Ca²⁺ influx." *The Plant Journal* 27.1 (2001): 1-12.
- Santos, Ana Paula, et al. "Abiotic stress and induced DNA hypomethylation cause interphase chromatin structural changes in rice rDNA loci." *Cytogenetic and genome research* 132.4 (2011): 297-303.
- Santos, Ana Paula et al. "Transcription Regulation of Abiotic Stress Responses in Rice: A Combined Action of Transcription Factors and Epigenetic Mechanisms." *OMICS: A Journal of Integrative Biology* 15.12 (2011): 839-857.

- Sasaki T. 1997. *Science of the Rice Plant (genetics)*, ed T Matsuo, Y Futsuhara, F Kikuchi, H Yamaguchi, 3:534-49. Tokyo: Nobunkyo
- Satake, Tetsuo, and Hiroshi Hayase. "Male sterility caused by cooling treatment at the young micro-spore stage in rice plants. 5. Estimations of pollen developmental stage and the most sensitive stage to coolness." *Nihon Sakumotsugaku Kai Kiji= Proceedings of the Crop Science Society of Japan* 39.4 (1970): 468-473.
- Sato, Yuko, et al. "Genetically encoded system to track histone modification in vivo." *Scientific reports* 3 (2013).
- Scheller, Henrik Vibe, and Anna Haldrup. "Photoinhibition of Photosystem I." *Planta* 221.1 (2005): 5–8.
- Schubert, Ingo, and Gunther Reuter. "Dynamics and functional aspects of histone modifications in plants." ULB Sachsen Anhalt
- Seck, Papa Abdoulaye et al. "Crops That Feed the World 7: Rice." *Food Security* 4.1 (2012): 7–24.
- Selker, Eric U. "Trichostatin A Causes Selective Loss of DNA Methylation in Neurospora." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95.16 (1998): 9430–9435.
- Shan, Da-Peng et al. "Cotton GhDREB1 Increases Plant Tolerance to Low Temperature and Is Negatively Regulated by Gibberellic Acid." *New Phytologist* 176.1 (2007): 70–81.
- Sharma, Rita et al. "Rice Cytosine DNA Methyltransferases - Gene Expression Profiling during Reproductive Development and Abiotic Stress: Rice Cytosine DNA Methyltransferases." *FEBS Journal* 276.21 (2009): 6301–6311.
- Shimono, Hiroyuki, et al. "Low temperature-induced sterility in rice: Evidence for the effects of temperature before panicle initiation." *Field crops research* 101.2 (2007): 221-231.
- Singh, Rajinder Pal, et al. "Economic analysis of breeding for improved cold tolerance in rice in Australia." *Australasian Agribusiness Review* 13 (2005).
- Strahl, Brian D., and C. David Allis. "The Language of Covalent Histone Modifications." *Nature* 403.6765 (2000): 41–45.
- Sunkar, Ramanjulu, Yong-Fang Li, and Guru Jagadeeswaran. "Functions of microRNAs in Plant Stress Responses." *Trends in Plant Science* 17.4 (2012): 196–203.
- Suzuki, Miho M., and Adrian Bird. "DNA Methylation Landscapes: Provocative Insights from Epigenomics." *Nature Reviews Genetics* 9.6 (2008): 465–476.
- Suzuki, Miho M., and Adrian Bird. "DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics." *Nature Reviews Genetics* 9.6 (2008): 465-476.
- Takahashi, Shunichi, and Norio Murata. "How Do Environmental Stresses Accelerate Photoinhibition?" *Trends in Plant Science* 13.4 (2008): 178–182.
- Timperio, Anna Maria, Maria Giulia Egidi, and Lello Zolla. "Proteomics applied on plant abiotic stresses: role of heat shock proteins (HSP)." *Journal of proteomics* 71.4 (2008): 391-411.
- Tiwari, Budhi Sagar, Beatrice Belenghi, and Alex Levine. "Oxidative stress increased respiration and generation of reactive oxygen species, resulting in ATP depletion, opening of mitochondrial permeability transition, and programmed cell death." *Plant physiology* 128.4 (2002): 1271-1281.
- Thomashow, Michael F. "Role of cold-responsive genes in plant freezing tolerance." *Plant physiology* 118.1 (1998): 1-8.
- Thomashow, Michael F. "Plant Cold Acclimation: Freezing Tolerance Genes and Regulatory Mechanisms." *Annual review of plant biology* 50.1 (1999): 571–599.
- Toledo-Ortiz, Gabriela, Enamul Huq, and Peter H. Quail. "The Arabidopsis Basic/Helix-Loop-Helix Transcription Factor Family." *The Plant Cell* 15.8 (2003): 1749–1770. *PMC*. Web. 27 Oct. 2015.
- Tóth, Katalin Fejes, et al. "Trichostatin A-induced histone acetylation causes decondensation of interphase chromatin." *Journal of cell science* 117.18 (2004): 4277-4287.
- Tyystjärvi, Esa. "Photoinhibition of Photosystem II." *International Review of Cell and Molecular Biology*. Vol. 300. Elsevier, 2013. 243–303.
- Valouev, Anton et al. "Genome-Wide Analysis of Transcription Factor Binding Sites Based on ChIP-Seq Data." *Nature Methods* 5.9 (2008): 829–834.
- Villar-Garea, Ana, and Axel Imhof. "The Analysis of Histone Modifications." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1764.12 (2006): 1932–1939.

- Voinnet, Olivier. "Origin, Biogenesis, and Activity of Plant MicroRNAs." *Cell* 136.4 (2009): 669–687.
- von der Haar, Tobias, and John EG McCarthy. "Intracellular Translation Initiation Factor Levels in *Saccharomyces Cerevisiae* and Their Role in Cap-Complex Function." *Molecular microbiology* 46.2 (2002): 531–544.
- Wada, Y. et al. "Preferential de Novo Methylation of Cytosine Residues in Non-CpG Sequences by a Domains Rearranged DNA Methyltransferase from Tobacco Plants." *Journal of Biological Chemistry* 278.43 (2003): 42386–42393.
- Waddington, Conrad H. "Canalization of development and the inheritance of acquired characters." *Nature* 150.3811 (1942): 563-565.
- Waddington, C. H. "The epigenetics of birds." (1952) New York: Cambridge Univ. Press.
- Walker, Scott E. et al. "Stability of Azacitidine in Sterile Water for Injection." *The Canadian journal of hospital pharmacy* 65.5 (2012): 352.
- Wang, Bing-Bing, and Volker Brendel. "Genomewide comparative analysis of alternative splicing in plants." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103.18 (2006): 7175-7180.
- Wan, Bingliang, Yongjun Lin, and Tongmin Mou. "Expression of Rice Ca²⁺-Dependent Protein Kinases (CDPKs) Genes under Different Environmental Stresses." *FEBS Letters* 581.6 (2007): 1179–1189.
- Winter, Stefan, and Wolfgang Fischle. "Epigenetic markers and their cross-talk." *Essays Biochem* 48 (2010): 45-61.
- Wu, Angela R., Joseph B. Hiatt, et al. "Automated Microfluidic Chromatin Immunoprecipitation from 2,000 Cells." *Lab on a Chip* 9.10 (2009): 1365.
- Wu, Angela R., Tiara L.A. Kawahara, et al. "High Throughput Automated Chromatin Immunoprecipitation as a Platform for Drug Screening and Antibody Validation." *Lab on a Chip* 12.12 (2012): 2190.
- Xiao, Huogen et al. "Three Grape CBF/DREB1 Genes Respond to Low Temperature, Drought and Absciscic Acid." *Plant, Cell and Environment* 29.7 (2006): 1410–1421.
- Xing, Shufan, and Yves Poirier. "The Protein Acetylome and the Regulation of Metabolism." *Trends in Plant Science* 17.7 (2012): 423–430. *CrossRef*. Web.
- Yamaguchi-Shinozaki, K. "A Novel Cis-Acting Element in an Arabidopsis Gene Is Involved in Responsiveness to Drought, Low-Temperature, or High-Salt Stress." *THE PLANT CELL ONLINE* 6.2 (1994): 251–264.
- Yamashita, Yo-ichi, et al. "Histone deacetylase inhibitor trichostatin A induces cell-cycle arrest/apoptosis and hepatocyte differentiation in human hepatoma cells." *International journal of cancer* 103.5 (2003): 572-576.
- Yamori, W. et al. "Phenotypic Plasticity in Photosynthetic Temperature Acclimation among Crop Species with Different Cold Tolerances." *PLANT PHYSIOLOGY* 152.1 (2010): 388–399.
- Yang, Yinong, Jyoti Shah, and Daniel F. Klessig. "Signal perception and transduction in plant defense responses." *Genes & Development* 11.13 (1997): 1621-1639.
- Yang, Fei et al. "Trichostatin A and 5-Azacytidine Both Cause an Increase in Global Histone H4 Acetylation and a Decrease in Global DNA and H3K9 Methylation during Mitosis in Maize." *BMC plant biology* 10.1 (2010): 178.
- Yoshida S, Foorno D, Cock J, Gomez K. Laboratory manual for physiological studies of rice. 3rd ed. Philippines: International Rice Research Institute; 1976.
- Yoshida, Minoru, et al. "Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A." *Journal of Biological Chemistry* 265.28 (1990): 17174-17179.
- Yoshida, Minoru, Sueharu Horinouchi, and Teruhiko Beppu. "Trichostatin A and trapoxin: novel chemical probes for the role of histone acetylation in chromatin structure and function." *Bioessays* 17.5 (1995): 423-430.
- Yoshida, R et al. "Cool-Temperature-Induced Chlorosis in Rice Plants." *Plant Physiology* 110.3 (1996): 997–1005.
- Zarka, Daniel G., et al. "Cold induction of Arabidopsis CBF genes involves multiple ICE (inducer of CBF expression) promoter elements and a cold-regulatory circuit that is desensitized by low temperature." *Plant Physiology* 133.2 (2003): 910-918.
- Zentner, Gabriel E., and Steven Henikoff. "High-Resolution Digital Profiling of the Epigenome." *Nature Reviews Genetics* 15.12 (2014): 814–827.

- Zhang, Meishan et al. "DNA Cytosine Methylation in Plant Development." *Journal of Genetics and Genomics* 37.1 (2010): 1–12.
- Zhang, Qi et al. "Advances in Understanding Cold Sensing and the Cold-Responsive Network in Rice." *Adv Crop Sci Tech* 1.1 (2013): 104.
- Zhang, W. et al. "Epigenetic Modification of Centromeric Chromatin: Hypomethylation of DNA Sequences in the CENH3-Associated Chromatin in Arabidopsis Thaliana and Maize." *THE PLANT CELL ONLINE* 20.1 (2008): 25–34.
- Zhang, Xiaoyu et al. "Genome-Wide High-Resolution Mapping and Functional Analysis of DNA Methylation in Arabidopsis." *Cell* 126.6 (2006): 1189–1201.
- Zhao, Lin, et al. "Transcriptional Regulation of Cell Cycle Genes in Response to Abiotic Stresses Correlates with Dynamic Changes in Histone Modifications in Maize." *PLoS ONE* 9.8 (2014): e106070.
- Zhao, Linmao et al. "Identification and Characterization of Histone Deacetylases in Tomato (*Solanum Lycopersicum*)." *Frontiers in Plant Science* 5 (2014): 760. *PMC*. Web. 3 Dec. 2015.
- Zhao, Rui et al. "Gene Bookmarking Accelerates the Kinetics of Post-Mitotic Transcriptional Re-Activation." *Nature Cell Biology* 13.11 (2011): 1295–1304.
- Zhiguo, E., et al. "Characterization of the Ubiquitin-Conjugating Enzyme Gene Family in Rice and Evaluation of Expression Profiles under Abiotic Stresses and Hormone Treatments." Ed. Girdhar K. Pandey. *PLoS one* 10.4 (2015): e0122621.
- Zhou, Xuefeng, et al. "Identification of cold-inducible microRNAs in plants by transcriptome analysis." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms* 1779.11 (2008): 780-788.
- Zhou, B.-R. et al. "Structural Insights into the Histone H1-Nucleosome Complex." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110.48 (2013): 19390–19395.
- Zhou, Dao-Xiu. "Regulatory Mechanism of Histone Epigenetic Modifications in Plants." *Epigenetics* 4.1 (2009): 15–18.
- Zhu, Jianhua, Chun-Hai Dong, and Jian-Kang Zhu. "Interplay between cold-responsive gene regulation, metabolism and RNA processing during plant cold acclimation." *Current opinion in plant biology* 10.3 (2007): 290-295.
- Zilberman, Daniel et al. "Genome-Wide Analysis of Arabidopsis Thaliana DNA Methylation Uncovers an Interdependence between Methylation and Transcription." *Nature Genetics* 39.1 (2007): 61–69.
- Zucchi, Fabiola Cristina Ribeiro, Youli Yao, and Gerlinde AS Metz. "The secret language of destiny: stress imprinting and transgenerational origins of disease." *Frontiers in genetics* 3 (2012): 96.

Endereços eletrônicos:

<http://faostat.fao.org/site/368/DesktopDefault.aspx?PageID=368#ancor> visto a 28 de Outubro de 2015

VIII - Anexos

Mutantes de Dongjin

Linhas mutantes adquiridas de POSTECH

DMT706 → *osdrm2* mutant (LOC_Os03g02010)



HAC704 → *oshac704* mutant (LOC_Os06g49130)



Figura 23 – Inserções de T-DNA nos genes de interesse (*OsDRM2* e *OsHAC704* respectivamente).

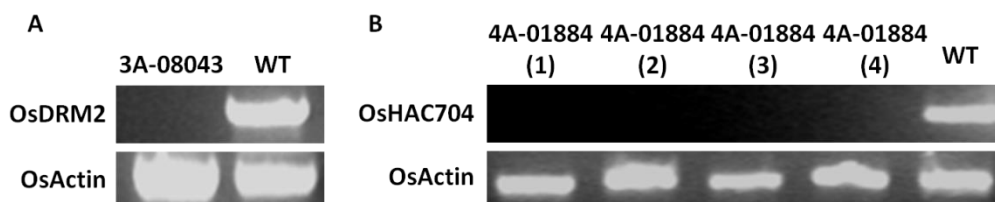


Figura 24 - RT-PCR semi-quantitativo demonstrando o silenciamento dos genes nas linhas mutantes. *OsActin* usado como controle.

Soluções

1. Meio Yoshida

Para fazer o meio Yoshida foi necessário produzir 6 soluções stock, 5 delas denominadas de Macronutrientes, e a restante de Micronutrientes.

1.1. Macronutrientes

As soluções de Macronutrientes foram feitas, com as seguintes massas pesadas, para um volume de 200 ml cada uma: para a solução de nitrato de amônia (NH_4NO_3 – Duchefa) dissolveu-se 12,28 gramas; para fosfato de sódio ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – Riedel-de Haën) dissolveu-se 8,046 gramas; para sulfato de potássio (K_2SO_4 – Fluka) 14,28 gramas; para o cloreto de cálcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – Duchefa) 23,43 gramas; e para o sulfato de magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – Sigma) 64,8 gramas.

1.2. Micronutrientes

A solução Micronutrientes foi feita utilizando as seguintes massas de cada constituinte: 0.2544 gramas de cloreto de manganês ($\text{MnCl}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – Sigma); 0.0148 gramas de molibdato de amônia ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ – Fluka); 0.007 gramas de sulfato de zinco ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – Duchefa); 0.1868 gramas de ácido bórico (H_3BO_3 – Duchefa); 0.0062 de sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – Duchefa); 1.54 gramas de cloreto férrico ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – Fluka); e 2.38 gramas de ácido cítrico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – Sigma).

As anteriores massas foram então utilizadas para fazer a solução stock de Micronutrientes. Para tal dissolveu-se o cloreto férrico em 10 ml de água, e os restantes em apenas 5 ml; misturou-se as 7 soluções em 100 ml de água, e agitou-se durante 15 minutos. A seguir adicionou-se 10 ml de ácido sulfúrico (H_2SO_4 – Sigma-Aldrich) e aferiu-se com água até aos 200 ml totais, sempre com agitação.

2. Soluções stock

2.1. Benlato

Dissolveu-se 1 grama de benlato/carbendazim (Sigma) em 1 litro de água bidestilada, e esterilizou-se em autoclave.

2.2. Solução de 5-Azacitidina

Dissolveu-se 39.1 mg de 5-azacitidina (Sigma-Aldrich) em 2 l de meio Yoshida, e esterilizou-se em autoclave. A concentração final pretendida foi de 80 μM . [Yamamoto et al., 2015] [Zhang et al., 2013]

2.3. Solução de Tricostatina A

Diluiu-se 750 μl de tricostatina A (Sigma-Aldrich - 10 mM em DMSO) em Yoshida, para um total de 0.5 l de meio com droga, e esterilizou-se em autoclave. A concentração final pretendida foi de 15 μM . [Baubec et al., 2009] [Zhang et al., 2013]

2.4. Soluções stock para imunoprecipitação de cromatina (ChIP)

2.4.1. B-mercaptoetanol

Foi usada uma solução stock de β -mercaptoetanol (14.3 M) da Sigma-Aldrich.

2.4.2. Butirato de Sódio

Dissolveu-se butirato de sódio (Aldrich) em água bidestilada, e guardou-se a solução em condições ambiente, com o schott envolvido em alumínio para evitar a degradação oxidativa induzida pela luz ambiente. A concentração final pretendida foi de 250 mM.

2.4.3. DTT (ditiotreitól)

Dissolveu-se ditiotreitól (Sigma-Aldrich) em água bidestilada, e esterilizou-se a solução.

A concentração final pretendida foi de 1 M.

Esta solução foi aliquoteada (1 ml por cada eppendorf de 1.5 ml) e guardada a -20 °C até ser usada.

2.4.4. EDTA pH 8

Dissolveu-se 18.61 gramas de ácido etilenodiaminotetra-acético (EDTA – Duchefa) em 100 ml de água, e esterilizou-se a solução. A concentração final pretendida foi de 0.5 M.

2.4.5. Formaldeído

Foi usada uma solução stock de p-formaldeído (37 % [v/v]) da Sigma-Aldrich. Esta solução é fulcral para a fixação da cromatina, e portanto deve-se apresentar transparente e íntegra, ou seja, se se apresentar com cor amarelada não deve ser usada para esta função pois encontrar-se-á oxidada, e como tal degradada.

2.4.6. Glicina

Dissolve-se 13.513 gramas de Glicina sólida (Sigma) por cada 45 ml aferidos com água milli-Q, de forma a obter uma solução de concentração 2 M. Depois de dissolvido, com agitação, a solução tem que ser passada por filtros com porosidade de 0.2 µm, e guardada a 4 °C até ser usada.

Esta solução deve ser usada no próprio dia, ou no dia seguinte, para evitar incluir contaminações no passo de fixação da cromatina.

2.4.7. Inibidor de proteases

A solução de inibição de proteases foi feita dissolvendo 6 pastilhas/tablets de Complete protease inhibitor (Roche) para obter uma solução 25x concentrada. Para efeito de conservação guardou-se a solução a -20 °C até que fosse necessária.

2.4.8. LiCl

Dissolve-se 8,478 gramas de cloreto de lítio (Sigma) em 50 ml de água bidestilada e esterilizou-se a solução.

A concentração final pretendida foi de 4 M.

A solução foi guardada em condições ambiente.

2.4.9. MgCl₂.(6H₂O)

Dissolveu-se 10.17 gramas de dicloreto de magnésio hexahidratado (MgCl₂.6H₂O - Duchefa) em 50 ml de água bidestilada, e esterilizou-se a solução. A solução final pretendida foi de 1 M.

2.4.10. NaCl

Dissolveu-se NaCl (Duchefa) em água bidestilada de forma a obter uma concentração de 5 M, e autoclavou-se a solução para a esterilizar.

2.4.11. PMSF (fenilmetilsulfonil flúor)

Foi usada uma solução stock de PMSF (100 mM).

2.4.12. Tris-HCl pH 6.8

Dissolveu-se 12.11 gramas de Tris(hidroximetil)/Trizma (Duchefa) em 100 ml de água bidestilada, e adicionou-se HCl (AppliChem) até a solução atingir pH de 6.8. De seguida esterilizou-se a solução em autoclave.

A concentração final pretendida foi de 1 M.

2.4.13. Tris-HCl pH 8

Dissolveu-se 30.29 gramas de Tris(hidroximetil)/Trizma (Duchefa) em 250 ml de água bidestilada, e adicionou-se HCl (AppliChem) até a solução atingir pH de 8.0. De seguida esterilizou-se a solução em autoclave.

A concentração final pretendida foi de 1 M.

2.4.14. Triton X-100

Utilizou-se Triton X-100 (20 M) da (Thermofisher).

2.4.15. SDS (dodecil sulfato de sódio)

Dissolveu-se dodecil sulfato de sódio (SDS – Sigma) em pó, de forma a obter uma solução de 10% m/v em água bidestilada (p.ex.: 10 gramas/100 ml). A solução foi guardada em condições ambiente.

2.4.16. Sucrose

Dissolve-se 150.612 gramas de Sucrose (Duchefa) por cada 110 ml aferidos com água milli-Q, de forma a obter uma concentração final 2 M. Depois de dissolver o açúcar, com agitação, a a solução tem que ser passada por filtro com porosidade de 0.45 µm, e guardada a 4 °C até ser usada.

Esta solução deve ser usada no próprio dia, ou no dia seguinte, para evitar incluir contaminações no passo de infiltração e/ou fixação da cromatina.

2.4.17. Tampões para Imunoprecipitação da cromatina (ChIP)

2.4.17.1. Passo de Infiltração

Os volumes em seguidas discriminados são para uma amostra apenas. É portanto necessário multiplicar o volume total de tampão pelo número de amostras a utilizar, para análises ou ensaios mais extensos.

Todos os tampões devem ser feitos no próprio dia, para evitar contaminações, e variação de concentrações por evaporação de solventes.

2.4.17.1.1. Tampão A

Misturou-se os seguintes volumes de soluções stock, para um total de 200 ml aferidos com água bidestilada esterilizada: 8 ml da solução de butirato de sódio (stock a 250 mM); 40 ml de sucrose (2M); 2 ml de Tris pH 8 (1 M); 70 µl de β-mercaptoetanol (14,3 M – Sigma-Aldrich); 200 µl de PMSF (100 mM); e 4.324 ml de formaldeído (37% v/v), para obter uma concentração final de 0.8 % (v/v).

2.4.17.1.2. Tampão B

Misturou-se os seguintes volumes de soluções stock, para um total de 40 ml aferidos com água bidestilada esterilizada: 1.6 ml de butirato de sódio (250 mM); 8 ml de sucrose (2M); 400 µl de Tris pH 8 (1 M); 13.99 µl de β-mercaptoetanol (14.3 M – Sigma-Aldrich); 40 µl de PMSF (100 mM); e 800 µl de Complete protease inhibitor (25x – Roche).

2.4.17.1.3. Tampão C

Misturou-se os seguintes volumes de soluções stock, para um total de 1 ml aferido com água bidestilada e esterilizada: 40 µl de butirato de sódio (250 mM); 125 µl de sucrose (2M); 10 µl de Tris pH 8 (1 M); 0.35 µl β-mercaptoetanol (14.3 M – Sigma-Aldrich); 1 µl de PMSF (100 mM); 10 µl de MgCl₂ (1 M); 50 µl de Triton X-100 (Thermofisher); e 40 µl de Complete protease inhibitor (25x – Roche).

2.4.17.1.4. Tampão D

Misturou-se os seguintes volumes de soluções stock, para um total de 1.8 ml aferidos com água bidestilada e esterilizada: 72 µl de butirato de sódio (250 mM); 1.476 ml de sucrose (2M); 18 µl de Tris pH 8 (1 M); 0.6 µl de β-mercaptoetanol (14.3 M – Sigma-Aldrich); 1.8 µl de PMSF (100 mM); 3.6 µl de MgCl₂ (1 M); 13.5 µl de Triton X-100 Thermofisher); e 72 µl de Complete protease inhibitor (25x – Roche).

2.4.17.1.5. Tampão E

Misturou-se os seguintes volumes de soluções stock, para um total de 300 µl aferidos com água bidestilada e esterilizada: 7.5 µl de Tris pH 8 (1 M); 3 µl de EDTA pH 8 (0.5 M); 15 µl de SDS (10% m/v); 0.3 µl de PMSF (100 mM); e 12 µl de Complete protease inhibitor (25x – Roche).

2.4.17.1.6. Tampão F

Misturou-se os seguintes volumes de soluções stock, para um total de 1.8 ml aferidos com água bidestilada e esterilizada: 90 µl de Tris pH 8 (1 M); 3.6 µl de EDTA pH 8 (0.5 M); 54 µl de NaCl (5 M); 9 µl de Triton X-100 (Thermofisher).

2.4.17.1.7. Tampão G

Misturou-se os seguintes volumes de soluções stock, para um total de 300 µl aferidos com água bidestilada e esterilizada: 18.8 µl de Tris pH 8 (1 M); 12 µl de NaCl (5 M); 60 µl de SDS (10% m/v); 3 µl de DTT (1 M).

2.4.17.2. Passo de Lavagem

Depois de feitas, todas as seguintes soluções foram esterilizadas em autoclave.

2.4.17.2.1. Tampão de lavagem de LiCl

Misturou-se os seguintes volumes de soluções stock, para um total de 500 ml aferidos com água bidestilada: 31.25 ml de LiCl (4 M); 25 ml de Igepal (Sigma Aldrich); 5 gramas de desoxicolato sódico (Sigma-Aldrich); 1 ml de EDTA pH 8 (0.5 M); e 10 ml de Tris pH 8 (1 M).

2.4.17.2.2. Tampão de lavagem de Low salt

Misturou-se os seguintes volumes de soluções stock, para um total de 500 ml aferidos com água bidestilada: 15 ml de NaCl (5 M); 5 ml de SDS (10% m/v); 25 ml de Triton X-100 (ThermoFisher); 2 ml de EDTA pH 8 (0.5 M); 10 ml de Tris pH 8 (1 M).

2.4.17.2.3. Tampão de lavagem de High salt

Misturou-se os seguintes volumes de soluções stock, para um total de 500 ml aferidos com água bidestilada: 50 ml de NaCl (5 M); 5 ml de SDS (10% m/v); 25 ml de Triton X-100 (ThermoFisher); 2 ml de EDTA pH 8 (0.5 M); 10 ml Tris pH 8 (1 M).

2.4.17.2.4. Tampão de lavagem de TE

Misturou-se os seguintes volumes de soluções stock, para um total de 500 ml aferidos com água bidestilada: 5 ml de Tris pH 8 (1 M); e 1 ml de EDTA pH 8 (0.5 M).